THESIS

AMSTERDAM 1938

DIE ANEURINBESTIMMUNG MITTELS DER THIOCHROM-METHODE UND IHRE ANWENDUNG AUF EINIGE LEBENSMITTEL

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD. CALIF 94305

J. A. WIEGAND

789
52W

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153504_0022

DIE ANEURINBESTIMMUNG MITTELS DER THIOCHROMMETHODE UND IHRE ANWENDUNG AUF EINIGE LEBENSMITTEL

DIE ANEURINBESTIMMUNG MITTELS DER THIOCHROMMETHODE UND IHRE ANWENDUNG AUF EINIGE LEBENSMITTEL

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS MR. P. A. J. LOSECAAT VERMEER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER ECONOMISCHE WETENSCHAPPEN, IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN DE AULA DER UNIVERSITEIT, OP WOENSDAG 14 DECEMBER 1938, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

JOHAN ALPHONS WIEGAND

GEBOREN TE AMSTERDAM

AMSTERDAM 1938
N.V. NOORD-HOLLANDSCHE UITGEVERS MAATSCHAPPIJ

575553

STELLINGEN.

I.

Het voorschrift van de Pharmacopee voor de ijking van levertraan op vitamine A gehalte, kan aanleiding geven tot onjuiste conclusies.

Nederl. Pharmacopee V Ed. 1ste Suppl., blz. 71.

II.

Ook voor de voorziening in onze behoefte aan vitamine B_1 is het gebruik van melk van groote beteekenis.

III.

De proeven door KARRER en KUBLI zoowel als door PYKE met de thiochroommethode gedaan, zijn onjuist uitgevoerd.

W. KARRER en U. KUBLI. Helv. Chim. Acta. **20**, 369 en 1147 [1937].
M. A. PYKE, Biochem. J. **31**, 1958 [1937].

IV.

Bij de beoordeeling van de beteekenis die een bepaald product heeft voor onze vitamine A voorziening, dient niet alleen het gehalte, doch ook de resorbeerbaarheid in oogenschouw genomen te worden.

M. VAN EEKELEN en W. PANNEVIS. Nature **141**, 203 [1938].
M. VAN EEKELEN, W. PANNEVIS en CHR. ENGEL. Acta brevia Neerl. **8**, 114 [1938].

V.

De suikerbepaling volgens SCHOORL-LUFF verdient de voorkeur boven die volgens SCHOORL-FEHLING.

N. SCHOORL. Chem. Weekbl. **26**, 130 [1929].

VI.

De door MAKINO en TAKAHASHI voorgestelde structuurformule voor de nucleinezuren uit gist en thymus is meer in overeenstemming met het chemische gedrag van die zuren dan de formule van LEVENE.

KATASHI MAKINO. Z. Physiol. Chem. **232**, 229 [1935].
HITOSHI TAKAHASHI. J. Biochem. (Japan) **16**, 463 [1932].
P. A. LEVENE en R. STUART TIPSON. J. Biol. Chem. **109**, 623 [1935].

VII.

De coli-bepaling in melk volgens SMIT moge beteekenis hebben voor de zuiveltechniek, voor een beoordeeling van de mate van faecale verontreiniging is ze niet geschikt.

J. SMIT. Hand. v. h. Genootschap t. Bevordering van Melkkunde. 1937 II.

VIII.

Invoering van een wettelijk geregelde contrôle op vitaminepreparaten, gevitaminiseerde producten en de vitaminereclame is mogelijk en zeer urgent.

IX.

Het streven van de regeering de wetenschap aan nationale belangen dienstbaar te maken en tot uitdrukking gekomen in de totstandkoming van de Centrale Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek, dient waar mogelijk bevorderd te worden.

Inschakeling van een soortgelijke organisatie ten behoeve van de klein-industrie, is gewenscht.

Aan de nagedachtenis van mijn Vader
Aan mijn Moeder

Thans, bij het beëindigen van mijn academische studie, betuig ik U, Hooggeleerde JANSEN, Hooggeschatte Promotor, en verder allen, die tot mijn wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen, mijn groote erkentelijkheid voor al hetgeen ik in de afgeloopen jaren van U heb mogen leeren.

Speciaal nog U, Hooggeleerde VAN NIEUWENBURG, betuig ik mijn hartelijken dank voor de gastvrijheid, die ik op Uw laboratorium heb mogen genieten.

De wetenschappelijke sfeer, die ik in zoo menigvuldige uiting heb leeren kennen, zal mij in mijn verdere werk steeds tot richtsnoer blijven.

INHALTSVERZEICHNIS.

KAPITEL I. Seite

Die Vitamin B_1 (= Aneurin) Bestimmung mittels der Thiochrommethode.

§ 1. Alte biologische und chemische Bestimmungsmethoden 1

§ 2. Prinzip und Beschreibung der Thiochrommethode 7

§ 3. Kurze Andeutung des untersuchten Materials in Zusammenhang mit den Schwierigkeiten in der Methode, welche im Laufe der Untersuchung zutagetraten 12

§ 4. Einige Faktoren, die von Einfluss auf die Resultate der Bestimmung sind 13

a) Einfluss des Lichtes 13

b) Einfluss der p_H auf die Adsorbierung von Aneurin an Frankonit 14

c) Einfluss der Menge Frankonit 15

§ 5. Untersuchung nach der Ursache des Einflusses der Frankonitmenge auf die Resultate der Aneurinbestimmung 19

§ 6. Die Abhängigkeit des Ausschlages je γ Aneurin von der Art des untersuchten Produktes 25

KAPITEL II.

Aneurinbestimmungen in Milch und Milchpulver.

§ 1. Einleitung 32

§ 2. Ausarbeitung der Methode 33

§ 3. Resultate der Aneurinbestimmung in Milch 40

§ 4. Aneurinbestimmung in Milchpulver 49

Kapitel III.

Seite

Aneurinbestimmung in Getreidearten und Kartoffeln.

§ 1. Einleitung 51

§ 2. Weizen 53

§ 3. Untersuchung der Nebenprodukte, die beim Mahlprozess entstehen 61

§ 4. Untersuchung einiger Muster von grobem Weizenbrot (Braunbrot) 66

§ 5. Untersuchung von Roggen 69

§ 6. Untersuchung von Gerste 71

§ 7. Untersuchung von Mais 72

§ 8. Aneurinbestimmung in Kartoffeln 73

Nachschrift 76

Samenvatting 78

Literatur 87

Kapitel I.

DIE VITAMIN B_1 (= ANEURIN) BESTIMMUNG MITTELS DER THIOCHROMMETHODE.

§ 1. Alte biologische und chemische Bestimmungsmethoden.

Bevor man sich ein Urteil über die Brauchbarkeit und die relative Genauigkeit der in dieser Dissertation beschriebenen und an der Praxis geprüften chemischen Bestimmungsmethode des Vitamins B_1 bildet, ist es m.E. erwünscht, kurz auf die bisher üblichen biologischen Methoden einzugehen und die sich bei ihnen ergebenden Schwierigkeiten kurz zu erwähnen.

In der einschlägigen Literatur ist eine grosse Anzahl biologischer Bestimmungsmethoden beschrieben. Die grosse Schwierigkeit liegt aber darin, dass fast jede Methode notgedrungen eine eigene Einheit hat. So kennt man prophylaktische und kurative Methoden bei Ratten, Tauben, Hunden, Reisvögeln und noch anderen Tieren, welche Methoden alle eine eigene Einheit haben. Ausserdem zeigt sich bei Vergleichung der von den verschiedenen Untersuchern bei derselben Methode gefundenen Resultate auch noch, dass diese letzteren grosse Unterschiede aufweisen können. Auch Versuche, ein reelles Verhältnis zwischen z.B. Ratten- und Taubeneinheiten zu bestimmen, werden störend durch die grossen Unterschiede beeinträchtigt, welche die verschiedenen Untersucher erhielten; (siehe hierüber: Jung: Zeitschr. f. Vitaminforschung **1**, 192 (1932).

Bei der Anwendung der prophylaktischen Methode bei Tauben bestimmt man diejenige Menge des zu untersuchenden Materials, die noch gerade imstande ist, Tauben mit einem Gewicht von ca. 250—350 g auf konstantem Gewicht zu halten.

WILLIAMS und WATERMAN (1) teilten mit, dass dieser Versuch für das Vitamin B_1 allein massgebend ist, wenn zugleich mit dem Futter ein Faktor, den sie B_3 nannten, verabfolgt wurde. Diese Versuche wurden von EDDY, GURIN und KERESZTESY (2), wie auch von CARTER, KINNERSLEY und PETERS (3) bestätigt. Die letzteren wiesen nach, dass zu einem normalen Wachstum der Versuchstiere ausser B_1 sogar zwei Vitamine erforderlich sind, nämlich Vitamin B_3 und B_5.

Da über das Vorkommen der Vitamine B_3 und B_5 nur noch wenig bekannt ist, bedeutet dieses Moment ein schweres Hemmnis für die prophylaktische Methode.

Zwecks Behebung dieses Übelstandes haben KINNERSLEY, PETERS und READER (4) vorgeschlagen, den kurativen Taubenversuch einzuführen. Als Einheit nehmen sie diejenige Menge, die, je Tag gerechnet, imstande ist, die Taube vor erneuten Krampfanfällen zu schützen. Sobald die Krampfanfälle sich deutlich entwickelt haben, gibt man den Tauben das zu untersuchende Präparat. Bei einer nicht zu geringen Menge desselben verschwindet der Krampf bereits schnell, und man bestimmt nun die Zeit, welche zwischen dem Verabfolgen des Präparates und dem erneuten Auftreten der Krampferscheinungen verläuft.

$$1 \text{ kurative Tauben-Einheit} = \frac{\text{verabfolgte Menge}}{\text{Anzahl krampffreie Tage}};$$

sie soll 2 γ Aneurin betragen. WINDAUS (5) fand später für seine Präparate aus Hefe 1,4—3,3 γ.

Von den Autoren dieser Methode wurde dieselbe während der Versuche, das Vitamin zu isolieren, zur Eichung von Präparaten gebraucht. Es ist möglich, dass diese Methode hierfür gut brauchbar ist; doch sie hat viele Nachteile, wenn man sie zur Bestimmung von Vitamin B_1 in Lebensmitteln anwenden wollte. Man müsste dann dem in Krampf liegenden Tiere ziemlich grosse Mengen des zu untersuchenden Produktes in den Kropf bringen, was oft unmöglich oder wenigstens sehr schwer sein wird, und ob das Tier in diesem anormalen Zustande wohl imstande sein wird, eine normale Menge des Vitamins B_1 zu resorbieren, ist sehr die Frage.

Als Standarisierungsmethode bei Ratten kommt an erster Stelle diejenige in Betracht, die von CHICK und ROSCOE (6) angewandt wurde. Diese Untersucher benutzen junge Ratten von ca. 50 g. Bei der vorgeschriebenen Grunddiät hält das Wachstum der Tiere

noch etwa zwei Wochen an, aber dann nehmen sie schnell an Gewicht ab. Nunmehr verabfolgt man das zu untersuchende Präparat. CHICK und ROSCOE nehmen als Einheit diejenige Menge, welche bei täglicher Verabfolgung eine wöchentliche Gewichtszunahme von 10—14 g ermöglicht.

READER (7) wies darauf hin, dass die Ratten zu einem normalen Wachstum nicht allein die Vitamine B_1 und B_2 benötigen, sondern auch noch einen neuen Faktor, den die Untersucherin B_4 nannte. Dieses Vitamin B_4 soll u.a. in Hefe vorkommen und meistens ein Begleiter des Vitamins B_1 sein.

CHICK und COPPING (8) beschrieben einen Y-Faktor, der wahrscheinlich mit dem später von GYÖRGY (9) beschriebenen Vitamin B_6, einem Rattendermatitisfaktor, identisch ist. In den folgenden Jahren ist noch eine Anzahl Faktoren beschrieben worden, die für ein normales Rattenwachstum erforderlich sein sollen (u.a. der Filtratfaktor KLINE JUKES' und LEPKOVSKY's). Welcher Wert allen diesen Faktoren beigemessen werden muss, wissen wir noch nicht; doch für die Beurteilung des Wertes des Tierversuches genügt es, zu wissen, dass auch hier noch eine Anzahl unbekannter Stoffe eine Rolle spielt, die uns zum Ziehen falscher Schlüsse verleiten könnten. Wenn der prophylaktische Versuch einen hinlänglichen exakten Wert besitzen soll, dann muss man erst noch besser über eine Reihe Nebenfaktoren orientiert sein.

Von KINNERSLEY, PETERS und READER ist aus den schon beim Taubenversuch besprochenen Gründen auch für Ratten die Anwendung der kurativen Methode befürwortet worden. Die Genannten nehmen als Einheit den Quotienten aus der verabfolgten Menge durch die Anzahl krampffreier Tage, das ist also, umgerechnet, diejenige Menge, die pro Tag erforderlich ist, gerade krampffrei zu bleiben. Sie fanden hierfür $2\frac{1}{2}$—3 γ, sodass eine kurative Ratten-Einheit gleich $1\frac{1}{2}$ Tauben-Einheiten sein würde.

SHERMAN (10) nimmt als Einheit diejenige Menge, die bei Verfütterung an etwa vier Wochem alte Ratten, deren Gewicht acht Wochen lang auf derselben Höhe erhält. Diese Einheit gebraucht er für seine Tabelle mit dem Vitamin B_1-Gehalt einer Reihe von Nahrungsmitteln.

Ein noch anderes Verfahren wendet SCHEUNERT (11) an. Er vergleicht nämlich die Wirkung des zu untersuchenden Präparates mit derjenigen einer bestimmten Menge Hefe, deren Wirkung auch wieder geeicht ist. Er gibt keine absolute Ziffern für die Wirkung

an, sondern spricht von sehr gut, gut, mässig, gering, sehr gering, wirkungslos. Wenngleich sich diese Methode auch für bestimmte orientierende Versuche als nützlich erweisen kann, ist sie doch als Standarisierungsmethode unbrauchbar.

In dem Laboratorium für physiologische Chemie in Amsterdam ist ein Verfahren üblich, das auf einer von SMITH (12) beschriebenen Methode basiert ist. Da ich dieses Verfahren für die Ausführung von Kontrollversuchen anwandte, werde dasselbe hier etwas ausführlicher beschrieben.

Jungen Ratten von etwa 100 g Gewicht wurde eine Vitamin B_1-freie Diät von folgender Zusammenstellung verabfolgt: 2700 g gewaschener Reis, 300 g autoklavierte Hefe, 90 g Kasein (Ashlesh), 90 g Salze, 30 g Lebertran.

Anfänglich nimmt das Gewicht der Versuchstiere noch zu; nach Verlauf von 10 bis 14 Tagen beginnt das Gewicht aber zu sinken, und nach einiger Zeit würden dann die charakteristischen Krampfanfälle auftreten. Ehe dieses Stadium erreicht wird, wird den Versuchstieren mittels einer Pipette eine Aneurinlösung in 40 %-igem Alkohol verabfolgt (1 ccm enthält 10 γ). Am nächsten Tage hat das Gewicht der Tiere bemerkbar zugenommen, wonach es wieder langsam sinkt. Sobald das ursprüngliche Gewicht wieder erreicht ist, werden aufs neue 10 γ B_1 verabfolgt, und auf diese Weise werden die Tiere dann „aufbewahrt".

Nachdem das Aneurin einige Male verabfolgt ist, lässt sich bestimmen, wieviele Tage eine bestimmte Ratte mit der verabfolgten Menge Vitamin (also 10 γ) auskommen kann; dieser Zeitraum ist 4—6 Tage.

Nachdem eine Ratte auf diese Weise geeicht ist, kann sie für die weiteren Versuche verwendet werden. Statt einer Aneurinlösung verabfolgt man das zu untersuchende Material, entweder (wenn dasselbe für die Tiere essbar ist) direkt oder (wenn man es z.B. an Fullererde adsorbiert hat) durch das gewöhnliche Futter gemischt. Man bestimmt, wieviel die Ratte von der zu prüfenden Substanz gegessen hat, danach, wie lange es dauert, bis nach dem Steigen das ursprüngliche Gewicht wieder erreicht ist, und dann kann man an Hand der Eichungstabelle den Vitamin B-gehalt berechnen.

Es bedeutete eine grosse Verbesserung als für diese Art Versuche das internationale Standardpräparat als Einheit eingeführt wurde. Dieses Präparat wurde aus einem Extrakt von Reiskleie durch Adsorption an Fullererde hergestellt.

Eine Internationale Einheit (I.E.) ist 10 mg dieses auf standarisierte Weise bereiteten Präparates.

Obgleich die Einführung der Internationalen Einheit ein bedeutender Fortschritt war, blieben doch noch Schwierigkeiten bestehen. Das Präparat war nämlich nicht rein und enthielt noch ziemlich viel Laktoflavin.

Gegenwärtig, nun das Vitamin B_1 auf synthetischem Wege herzustellen ist, steht nichts mehr der Einführung des reinen Präparates als Einheit im Wege.

Ausser den bisher beschriebenen biologischen Methoden gibt es noch zwei weitere, die in den letzten Jahren hinzugekommen sind und die beide von der gewöhnlichen Bestimmungsweise abweichen. Beide Methoden können auf ihrem Gebiete zwar gute Dienste leisten, sind aber ziemlich schwer ausführbar. Es sind dies die von PETERS und seinen Mitarbeitern angewandte Katatorulinprobe (1931) und die Bradykardiemethode HARRIS' (1934).

Verschiedene Untersucher hatten bezüglich des Zusammenhanges zwischen dem Vitamin B_1 und der Sauerstoffaufnahme tierischer Gewebe sich widersprechende Ansichten verkündigt, die PETERS und GAVRILESCU (13) in Einklang bringen konnten. Sie wiesen nach, dass zwar kein Unterschied zwischen der Sauerstoffaufnahme von Gehirngewebe (in einer Ringerschen Phosphat-Pyruvat-Lösung suspendiert und nach der Warburgschen Methode gemessen) gesunder und B_1-avitaminotischer Tiere bestand, dass aber ein sehr deutlicher Unterschied zutagetrat, wenn Glukose und einige andere Stoffe der Ringerschen Lösung zugesetzt wurden.

In den folgenden Jahren konnte PETERS (14) die Technik der Methode erheblich verbessern. Nach Hinzufügung von B_1-Präparaten zu der Ringerschen Lösung ist der Sauerstoffverbrauch des Gewebes ein Mass für die Menge hinzugefügten B_1 (siehe auch: WESTENBRINK und POLAK (15)).

Die Bradykardiemethode HARRIS' (16) beruht auf der Messung der Frequenz des Herzschlages von Ratten mittels eines Elektrokardiographen. Nachdem der Herzschlag unter Einfluss einer B_1-freien Nahrung von dem normalen Wert (500—550 Schläge je Minute) auf etwa 350 Schläge gesunken ist, wird dem Tiere das zu untersuchende Präparat verabfolgt.

Nach 24 Stunden wird die Frequenz aufs neue gemessen, und sowohl die Zunahme selbst als deren Zeitdauer dienen als Mass für die Menge hinzugefügten Vitamins. Es ist indessen stark zu

bezweifeln, ob diese Methode wohl allgemein brauchbar ist, an erster Stelle, weil der verminderte Herzschlag nicht spezifisch für Beriberi ist, und zweitens, weil derselbe u.a. durch Adeninderivate ziemlich stark beeinflusst wird. (Birch und Mann (40)).

Natürlich hat man auch schon seit langem versucht, den Vitamin B_1-Gehalt in verschiedenen Nahrungsmitteln auf chemischem Wege zu bestimmen. Alle alten Methoden waren indirekte und fast immer auf der Frage basiert, ob der Reis noch genügend vom Silberhäutchen enthielt. Dies ist nicht zu verwundern, da die Beriberi-Bekämpfung in den Tropen fast ausschliesslich auf der Art der Reisversorgung beruhte.

Es lohnt sich nicht der Mühe, diesen Versuchen zu viel Aufmerksamkeit zu schenken. Sie haben gegenwärtig keine Bedeutung mehr, nur aus historischen Erwägungen verdienen sie Erwähnung. Vorgeschlagen sind:

1. die P_2O_5-Bestimmung (siehe für ausführliche Daten hierüber (17)).

2. die Alkoholprobe Ottows (18), die sich jedoch als völlig falsch erwies.

3. die Jodprobe, die auf dem Blaufärben derjenigen Stellen des Reiskornes beruht, wo das Silberhäutchen verschwunden ist und also die Stärke des Kernes mit dem Jod reagieren kann.

4. eine von Jendrassik (19) vorgeschlagene Farbenreaktion mit $FeCl_3 + K_3Fe(CN)_6$ in saurem Milieu. Van Veen wies nach, dass eine eventuell auftretende Färbung nichts mit dem Vitamin B_1 zu tun hat.

5. Als letzte Methode ist diejenige Spruyt's (17) zu nennen. Er adsorbierte das Vitamin aus Reisextrakt an acid clay, wodurch eine weitgehende Reinigung erreicht wurde. Nach Elution mit Baryt, wovon das Übermass mit Schwefelsäure entfernt wurde, führte er mittels Phosphorwolframsäure einen Niederschlag herbei. Die Menge des letzteren bestimmte er anfangs kalorimetrisch, später durch Messen des Volumens des Niederschlages in einer Hämatokritröhre.

Ausser diesen fünf, jetzt ganz aufgegebenen Methoden sind in der Literatur der letzten Jahre noch drei andere Methoden genannt, die als Methoden für direkte Bestimmung mehr Bedeutung haben. 1934 publizierten Kinnersley und Peters (20) ihre Methode mit Verwendung von diazotierter Sulfanilsäure, und 1936 berichteten Prebluda und Mc.Collum (21) über eine Reak-

tion mit diazotiertem p-Animo-Acetanilid. Beide genannte Methoden haben indessen den Nachteil, dass sie allein für Bestimmungen reiner Lösungen des Aneurins brauchbar sind; die Reaktionen sind wenig spezifisch.

Schliesslich wurde in diesem Jahre noch eine Methode zur Vitamin B_1-Bestimmung von WILLSTAEDT und BARANY (22) vorgeschlagen. Dieselbe beruht auf der Bildung eines in Äther löslichen Azofarbstoffes bei der Einwirkung von diazotiertem 2,4 Dichloranilin auf Aneurin. Die Intensität der Farbe wird im PULFRICH-Photometer gemessen. Nach Angabe der Autoren soll diese Methode auch für die Aneurinbestimmung in Hefeextrakt u. dergl. brauchbar sein.

Für Aneurinbestimmungen auf breiterer Basis erweist sich weiter bis jetzt allein die Thiochrommethode JANSENS (23) als brauchbar.

§ 2. PRINZIP UND BESCHREIBUNG DER THIOCHROMMETHODE.

Im Jahre 1936 publizierte JANSEN eine Methode zur Bestimmung des Aneurins auf chemischem Wege. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass Aneurin in alkalischem Milieu mit $K_3Fe(CN)_6$ oxydiert, in Thiochrom übergeht, eine Substanz, die von KUHN und Mitarbeitern (24) aus Hefe isoliert wurde und die bei Bestrahlung mit ultra-violettem Licht blau fluoresziert. Wenn das Thiochrom in ein COHENSches Fluorometer (25) gebracht wird, kann die Intensität des Fluoreszenzlichtes gemessen werden.

Bei dem Ausarbeiten der Bestimmungsmethode konnte man folgende, für die definitive Vorschrift wichtige Tatsachen konstatieren:

1. In alkalischem Milieu ist Aneurin oxydabel; durch Luft-Sauerstoff wird es teils zu Thiochrom, teils zu nicht-fluoreszierenden Substanzen oxydiert; durch Kaliumferricyanid wird das Aneurin, falls das Milieu sehr alkalisch ist, quantitativ zu Thiochrom oxydiert.
2. Das gebildete Thiochrom wird durch ein Übermass $K_3Fe(CN)_6$ in eine nicht mehr fluoreszierende Substanz verwandelt.
3. Durch Zusatz von Methylalkohol wird die Empfindlichkeit des gebildeten Thiochroms für ein Übermass $K_3Fe(CN)_6$ vermindert.

Auf Grund späterer Erfahrungen hatte man die folgende

Vorschrift ausgearbeitet, die jedoch schon von der in der ursprünglichen Publikation gegebenen abweicht.

Die Adsorption.

Man geht von einer geeigneten Menge wässerigen Extraktes des zu untersuchenden Materials aus, dessen p_H = ca. 3 (Umschlagpunkt von Congopapier) sein muss. Diesem Extrakt fügt man 1 g Frankonit hinzu und nach etwa zwei Minuten Rühren ist alles Aneurin an dieses Frankonit adsorbiert. Danach zentrifugiert man das Frankonit ab, wäscht dieses einige Male mit Wasser eines p_H = 3 aus, wäscht noch einmal mit 96 %-igem Alkohol nach und trocknet das Frankonit schliesslich in derselben Zentrifugenröhre bei 100° in einem Trockenschrank.

Nach dem Trocknen wird das Frankonit gut fein pulverisiert und gründlich gemischt.

Von diesem aktivierten Frankonit wägt man nunmehr einige Portionen von 100 mg ab, die in die Röhren gebracht werden, in welchen man die Oxydation ausführen will (ich benutzte hierfür Zentrifugenröhren von 2½ cm Durchmesser und 13 cm Höhe).

Die Oxydation.

Die 100 mg Frankonit in der ersten Röhre dienen zu einer Blankobestimmung (siehe dort); die folgenden Portionen werden folgendermassen behandelt:

1. Man fügt 2 ccm 96 %-iges Methanol hinzu und lässt darauf während des ganzen weiteren Versuches einen kontinuierlichen Stickstoffstrom durch die Flüssigkeit quirlen.
2. Nach 30 Sek. fügt man 1 ccm 30 %-ige NaOH hinzu, wodurch das Aneurin eluiert wird.
3. Nach weiteren 30 Sek. setzt man der gewählten Menge 1 %-iges $K_3Fe(CN)_6$ zu, in jeder Röhre etwas mehr als in der vorigen (z.B. 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0 ccm).
4. Nach 30 Sek. ist die Oxydation vollendet und setzt man 2 ccm destilliertes Wasser und 13 ccm Isobutanol hinzu.
5. Nach 1 Minute schliesst man den Stickstoffstrom ab, verschliesst die Röhre mit einem Korken und beginnt mit der folgenden Bestimmung.

Mit der Blankobestimmung werden dieselben Massnahmen ausgeführt, ausser der Oxydation mit dem Blutlaugensalz, also: 2 ccm 96 %-iges Methanol hinzufügen, nach 30 Sek. 1 ccm 30 %-ige

Lauge zusetzen, nach 1 Minute 2 ccm Wasser und 13 ccm Isobutanol und dann noch eine weitere Minute Stickstoff hindurchleiten.

Das Resultat der Blankobestimmung gibt also an, welcher Teil des Fluoreszenzlichtes, das bei der Oxydierung einer gewöhnlichen Bestimmung entsteht, auf Rechnung anderer Stoffe als des gebildeten Thiochroms gesetzt werden muss.

Der Stickstoffstrom bezweckt, die Luft aus der Flüssigkeit zu vertreiben, um einer unerwünschten Oxydation vorzubeugen und kann zugleich dazu dienen, die Reaktionsflüssigkeit gut zu mischen.

Darauf werden die beiden Flüssigkeitsschichten in den Röhren durch Zentrifugieren geschieden und werden von jeder Röhre 10 ccm der Isobutanolschicht in Fluorometerröhren gebracht. Dies sind Reagenzröhren aus nicht-fluoreszierendem Glas, welche überall genau gleich weit sind und auf eine gleich zu beschriebende Weise auf ihre Brauchbarkeit geprüft sein müssen. Dann wird nun die Fluoreszenz aller Röhren im Fluorometer gemessen.

Das Fluorometer.

Als Lichtquelle dient eine Quecksilberlampe, Philips' Analyselampe H.P.W. 75. Das Licht derselben fällt erst auf ein Filter von gewöhnlichem Fensterglas, wodurch die Wärmestrahlen in starkem Masse zurückgehalten werden. Danach muss es ein Nickeloxydfilter passieren, wobei alle sichtbaren Strahlen absorbiert werden. Das durchgelassene ultra-violette Licht muss darauf die Reagenzröhre mit der Isobutanollösung passieren. Das Fluoreszenzlicht fällt darauf auf ein Filter von Euphosglas, wo alle ultravioletten Strahlen absorbiert werden. Es ist notwendig, dieses Filter einzuschalten, da andernfalls, sogar bei Gebrauch von destilliertem Wasser in der Versuchsröhre, das Galvanometer einen ziemlich grossen Ausschlag gibt.

Nachdem das Fluoreszenzlicht das Euphosfilter passiert hat, fällt es auf die Selenzelle. Der dadurch in der Zelle erzeugte elektrische Strom wird mit einem Multiplex-Galvanometer, Typus M.G. 2 gemessen. Der innere Widerstand desselben beträgt 1000 Ω, die Empfindlichkeit ist 4×10^{-9} Ampère (siehe Fig. 1).

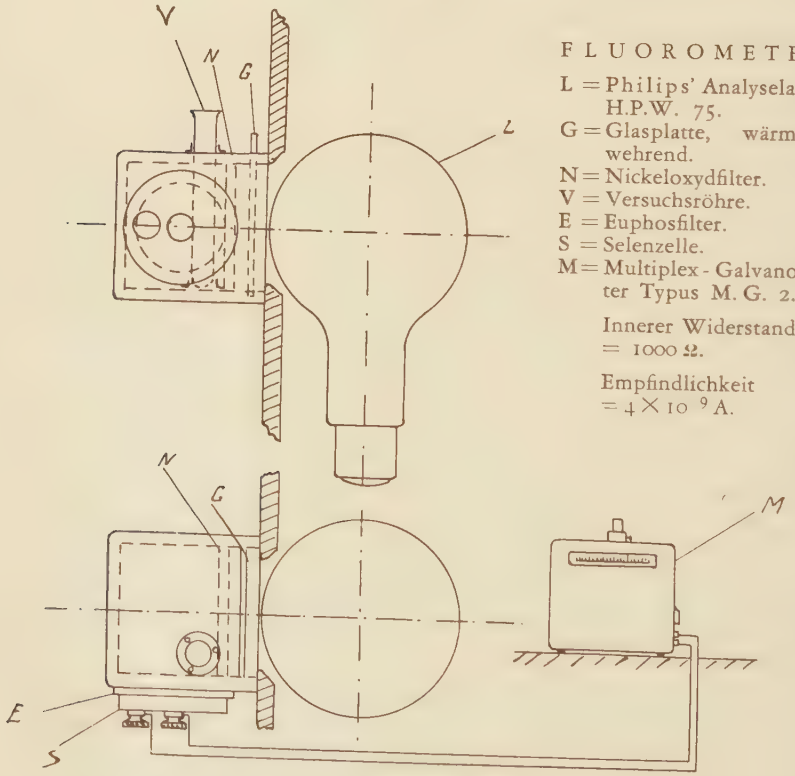
Die Messung und die Berechnung.

Zunächst bestimmt man den Nullpunkt des Galvanometers, indem man in das Fluorometer eine Röhre mit destilliertem

Wasser stellt. Darauf muss man die Intensität des Lichtes der Quecksilberlampe messen, da dieses niemals völlig konstant ist. Zu diesem Zwecke bringt man in das Fluorometer eine Röhre mit einer 1 %-igen Chininlösung in verdünnter Schwefelsäure. Diese Lösung ist lange haltbar und wird immer aufs neue für jede Reihe Messungen verwendet. Der Ausschlag des Galvanometers für diese Chininlösung, vermindert um den Ausschlag für das destillierte Wasser, ist ein Mass für die Lichtintensität der Lampe. Der für die Thiochromlösung abgelesene Ausschlag muss nun stets auf einen konstanten Ausschlag für die Chininlösung korrigiert werden, wenn man vergleichbare Ziffern erhalten will.

Um nun bei einer Bestimmung zu wissen, wie gross der Ausschlag des bei der Oxydation gebildeten Thiochroms ist, muss man den Ausschlag für diese Lösung um den Ausschlag der

Fig. 1.



FLUOROMETER.

L = Philips' Analyselampe H.P.W. 75.
G = Glasplatte, wärmeabwehrend.
N = Nickeloxydfilter.
V = Versuchsröhre.
E = Euphosfilter.
S = Selenzelle.
M = Multiplex-Galvanometer Typus M. G. 2.

Innerer Widerstand = 1000 Ω.

Empfindlichkeit = 4×10^{-9} A.

Blankobestimmung vermindern. Dieser Unterschied, korrigiert auf den angenommenen Basisausschlag der Chininlösung, ergibt das Mass für die vorhandene Menge Thiochrom.

Ein Zifferbeispiel möge dies alles verdeutlichen:

Ausschlag des Galvanometers für destilliertes Wasser .... 1 mm
" " " " die Chininlösung ..... 78 mm
" " " " die Blankobestimmung 4 mm
" " " " die Thiochromlösung .. 38 mm

Basis für die Berechnung ist immer ein Ausschlag für die Chininlösung von 75 mm.

Der wirkliche Ausschlag für die Thiochromlösung ist 38 — 4 = 34 mm.

Der korrigierte Ausschlag für die Thiochromlösung ist also: $34 \times \frac{75}{77} = 33$ mm.

Wenn man nun erst bestimmt hat, wie gross der Ausschlag des Galvanometers ist, wenn man 1 γ Aneurin in der vorgeschriebenen Weise behandelt, dann kann man, da der Ausschlag des Galvanometers linear mit der Menge Aneurin verläuft, ohne weiteres aus dem korrigierten Ausschlag für die Thiochromlösung die Anzahl Gammas Aneurin berechnen. Wenn 1 γ Aneurin einen Ausschlag von z.B. 5 mm ergibt, dann entsprechen einem Ausschlag von 33 mm 6,6 γ Aneurin. Hat man für eine Bestimmung 100 mg Frankonit abgewogen, während man dem ursprünglichen Extrakt 1 g Frankonit zugesetzt hat, dann enthält diese Menge Extrakt also 66 γ Aneurin.

Kontrolle der Fluorometerröhren.

Zum Erhalten zuverlässiger Ziffern ist es erforderlich, dass alle Fluorometerröhren auf einen konstanten Ausschlag kontrolliert werden. Man benutzt dafür am besten die Standardchininlösung. Die Ausschläge, welche diese Lösung in den verschiedenen Röhren bei Placieren in dem Fluorometer ergeben, dürfen nicht mehr als 1 mm voneinander abweichen; abweichende Röhren sind unbrauchbar.

Spezifität der Reaktion.

Nun ist noch die Frage zu beantworten, ob die Thiochrommethode spezifisch ist. Man hat dies wohl einmal bezweifelt, m.E. etwas zu Unrecht. In der Tat kommen in der Natur auch andere

Stoffe vor, welche bei Bestrahlung mit ultra-violettem Licht im blauen Fluoreszenzlicht aussenden; hierin haben die Kritiker recht. Infolge des Umstandes jedoch, dass wir als Mass für den Thiochromgehalt den Intensitätsunterschied zwischen dem Fluoreszenzlicht der Blanko- und der oxydierten Bestimmung annehmen, messen wir nicht alles blaue Fluoreszenzlicht, sondern nur dasjenige Licht, das von einem Stoffe herrührt, der erst nach Oxydierung in alkalischem Milieu blau fluoresziert. Eine derartige Eigenschaft kennen wir bis heute nur für das Aneurin.

§ 3. Kurze Andeutung des untersuchten Materials in Zusammenhang mit den Schwierigkeiten in der Methode, welche im Laufe der Untersuchung zutagetraten.

Als ich mit der Untersuchung anfing, standen mir die im vorigen Paragraphen beschriebenen Data zu Dienst, und die dort gegebene Vorschrift war der Ausgangspunkt. Bei der Anwendung traten jedoch immer mehr Tatsachen zutage, die mir die Erkenntnis brachten, dass die in § 2 gegebene Grundlage der Methode nur eine sehr annäherungsweise war.

Statt nun schon gleich die Untersuchung der von mir nacheinander untersuchten Lebensmittel zu beschreiben, durch welches Verfahren die schliesslich angewandte Methode nur sehr unübersichtlich zur Entwicklung kommen könnte, halte ich es für besser, alle im Laufe der Untersuchung erhaltenen methodischen Daten erst zu behandeln, wodurch dann ein logischeres und deutlicheres Bild der Bestimmung selbst gebildet werden kann. Hierfür ist es jedoch erforderlich, dass ich in einer kurzen Vorbetrachtung eine Übersicht gebe über das untersuchte Material und die Weise, wie dieses behandelt wurde, ehe die eigentliche Bestimmung ausgeführt werden konnte.

Es wurde mit Milch begonnen. Nachdem sich gezeigt hatte, dass man durch das Vornehmen einer Korrektur den Fehler, der dadurch entstand, dass das Aneurin nicht bei dem vorgeschriebenen $p_H = 3$, sondern bei dem eigenen p_H der Milch (6,4—6,6) an das Frankonit adsorbiert wurde, vermeiden konnte, ging ich von 200 ccm Milch aus, die auf 800 ccm mit Wasser verdünnt wurde, und der dann meistens 1 g Frankonit zugesetzt ward. Diese Verdünnung geschah aus zwei Gründen. In erster Linie hatten Westenbrink und Goudsmit (26) bei der B_1-Bestimmung im Harn gefunden, dass bessere Resultate erhalten wurden, wenn der Harn vor dem

Hinzufügen des Frankonits verdünnt wurde, und zweitens war es dann leichter, die durch das Zentrifugieren entstandene Schicht Milchfett zu entfernen. Mittels der in § 2 beschriebenen Bearbeitungen wurden dann meistens Portionen von 100 mg Frankonit oxydiert und die Resultate auf einen Liter Milch umgerechnet.

Nach der Untersuchung von Milch wurden verschiedene Getreidearten untersucht, nämlich Weizen, Roggen, Gerste und Mais. Dies geschah in grossen Zügen folgendermassen:

Eine geeignete Menge des Getreides wurde fein gemahlen und mit einer genügenden Menge Wasser (meistens im Verhältnis von 1 : 5) bei einem $p_H = 3$ und einer Temperatur von 50° während 3—4 Stunden extrahiert. Man liess den Niederschlag sich absetzen (oder zentrifugierte ab), und behandelte den Rückstand noch einmal in derselben Weise. Nach zwei Stunden wurde wieder abzentrifugiert, der Rückstand wurde noch einmal mit Wasser ausgewaschen und schliesslich wurde alle abzentrifugierte Extraktionsflüssigkeit vereinigt.

Um einem Verderben des Extraktes vorzubeugen, wurde derselbe mittels 250 mg Benzoesäure je Liter Extrakt konserviert.

§ 4. Einige Faktoren, die von Einfluss auf die Resultate der Bestimmung sind.

a) *Einfluss des Lichtes.*

Während der Untersuchung wurde konstatiert, dass das Thiochrom lichtempfindlich war. Um hierüber einen genaueren Eindruck zu erlangen, wurden einige Kontrollversuche angestellt, die folgendes Resultat ergaben:

100 mg Milch-Frankonit wurden oxydiert und gemessen. Der Ausschlag des Galvanometers war 21 mm. Darauf wurde eine zweite Portion desselben Frankonits oxydiert, die aber erst nach 1½-stündigem Stehen in diffusem Tageslicht gemessen wurde. Der Ausschlag betrug diesmal nur 17 mm.

Dass diese Abnahme in der Tat durch den Einfluss des Lichtes bewirkt wird, erhellt auch aus den folgenden Ziffern, welche ein anderes Muster aktiviertes Frankonit ergab:

Grösse des Ausschlages,						gleich nach der Oxydation gemessen	.....	27 mm
„	„	„				nach einstündiger Aufbewahrung	im Dunkeln	27 mm
„	„	„	„		„	„	in diffusem Licht	22 mm
„	„	„	„	zweistündiger		„	im Dunkeln	26 mm
„	„	„	„	„		„	in diffusem Licht	18 mm

Diese Ziffern beweisen somit wohl, dass beim Ausführen der Vitaminbestimmung das Licht hintangehalten werden muss und dass die Messung nach der Oxydierung so schnell wie möglich zu erfolgen hat.

b. *Einfluss der p_H auf die Adsorbierung von Aneurin an Frankonit.*

Jansen hatte vorgeschrieben, dass die Adsorption von Aneurin an das Frankonit bei einem $p_H = 3$ erfolgen müsse. Bei Milch war dies jedoch wegen des Ausflockens von Kasein nicht angängig (siehe Näheres hierüber bei dem Kapitel: Aneurinbestimmung in Milch), sondern musste diese Adsorption bei dem eigenen p_H der Milch ($p_H = 6{,}4$ bis $6{,}6$) vorgenommen werden. Es stellte sich nun heraus, dass unter diesen Umständen das Aneurin nicht quantitativ adsorbiert wurde: Wenn man nach Abzentrifugieren des Frankonits aufs neue 1 g Frankonit der Milch zusetzte, zeigte sich, dass auch diese zweite Portion noch Aneurin adsorbiert hatte.

Beim Ausarbeiten desselben ergab sich nun, dass ein konstantes Verhältnis zwischen den Mengen Aneurin besteht, die an die erste und an die zweite Portion Frankonit adsorbiert werden.

Ich setzte einer Anzahl Portionen Milch (von je 250 ccm) nach Verdünnen bis auf ein Liter steigende Mengen Aneurin zu. Jede Portion wurde zweimal mit 1 g Frankonit behandelt, wovon 100 mg oxydiert wurden. Hierbei fand ich folgende Galvanometerausschläge:

	erste Portion Frankonit	zweite Portion Frankonit	Verhältnis
Versuch 1	23 mm	2 mm	$11\frac{1}{2} : 1$
„ 2	34 mm	4 mm	$8\frac{1}{2} : 1$
„ 3	47 mm	5 mm	$9\frac{1}{2} : 1$
„ 4	71 mm	8 mm	9 : 1
„ 5	119 mm	13 mm	9 : 1

Wenn wir den ersten Versuch wegen des geringen Ausschlages und mithin der prozentual geringen Genaugkeit ausser Betracht lassen, dann zeigt sich, dass das betreffende Verhältnis ungefähr

9 : 1 beträgt. Es wird also nicht nötig sein, die Milch immer zweimal mit Frankonit zu behandeln, sondern es genügt, die Ziffer der ersten Adsorption um 11 % zu erhöhen, um den Gesamt-Aneuringehalt zu finden.

Wird jedoch beim Adsorbieren des Aneurins aus irgendeinem Grunde von dem vorgeschriebenen p_H abgewichen, dann muss also immer die unvollständige Adsorption berücksichtigt und der Adsorptionskoeffizient für jenen in Frage stehenden p_H bestimmt werden.

c. *Einfluss der Menge Frankonit.*

Beim Bestimmen des Vitamin B_1-Gehaltes in Milch waren gute Ergebnisse durch Beachtung des folgenden Verfahrens erzielt worden:

Man verdünne 200 ccm Milch bis auf ein Liter, füge 1 g Frankonit hinzu und oxydiere schliesslich eine Portion von 100 mg dieses aktivierten Frankonits.

Wenn wir diesen 200 ccm Milch bekannte Mengen Aneurin zusetzten, wurden diese Mengen immer quantitativ wiedergefunden, wenn der Berechnung ein Ausschlag des Galvanometers von 5 mm für 1 γ Aneurin zugrundegelegt wurde, welcher Wert früher sowohl von JANSEN als von WESTENBRINK und GOUDSMIT (26) gefunden worden war.

Bei der Untersuchung von Weizenmehl wurde folgendermassen verfahren: Ein Liter Extrakt wurde mit 1 g Frankonit behandelt, während einer zweiten Portion Extrakt (von 1 Liter) 50 γ Aneurin und danach ebenfalls 1 g Frankonit zugesetzt wurde. Von beiden Frankonitmustern wurden 100 mg oxydiert und gemessen. Berechnet wurde ein Unterschied in den Ausschlägen von (50 : 10) $\times$ 5 = 25 mm. Die Ausschläge waren bezw. 35 und 18 mm, wiesen also einen faktischen Unterschied von nur 17 mm auf.

Diese als misslungen betrachtete Bestimmung musste also wiederholt werden. am liebsten mit demselben Frankonitmuster. Nunmehr wurde die Oxydierung statt mit 100 mg mit einer Portion von 50 mg ausgeführt. Der Ausschlag war nun aber nicht $\frac{1}{2} \times 35 = 17\frac{1}{2}$ mm, sondern 22 mm. Dieses Ergebnis schien also darauf hinzuweisen, dass beim Gebrauch von 100 mg Frankonit nicht alles Aneurin oxydiert worden war. Um diesbezüglich Bestätigung zu erlangen, wurden nun noch einmal 50 mg Frankonit oxydiert, das von einem Extrakt herrührte, dem keine Extramenge Aneurin zugesetzt war. Für 100 mg war der Aus-

schlag 18 mm gewesen; für 50 mg war er 12 mm, also 3 mm mehr als die Hälfte.

In einer Tabelle geordnet, haben wir somit gefunden:

	I	II	Unterschied
100 mg Frankonit oxydiert.....	18 mm	35 mm	17 mm (5 γ B_1)
50 mg „ „	12 mm	22 mm	10 mm ($2^1/_2 \gamma$ B_1)

Adsorption an 1 g Frankonit.

I bedeutet 1 Liter Weizenextrakt ohne extra B_1-Hinzufügung.

II bedeutet 1 Liter desselben Extraktes, dem 50 γ B_1 zugefügt wurden.

Dieselbe Erfahrung wurde bei dem internationalen B_1-Standardpräparat gemacht; bei ihm wurde ein Ausschlag von bezw. 16 und 26 mm gefunden bei Oxydierung von bezw. 50 und 100 mg.

Aus diesen Daten erhellt, dass um so mehr Verluste auftreten, je grössere Mengen aktiviertes Frankonit oxydiert werden. Es liegt also auf der Hand, eine Messung in einer Aneurinlösung vorzunehmen, ohne dass erst Adsorption an Frankonit stattgehabt hat.

In 20 ccm 96 %-igem Methanol wurden 50 γ Aneurin gelöst, und hiervon wurden 2 ccm oxydiert. In diesen 2 ccm Methanol hatten wir auf diese Weise mit grosser Genauigkeit die gewählte Menge Aneurin; es lag also genau die Situation vor, die bei der gewöhnlichen Oxydation immer vorhanden war, nun aber ohne die Anwesenheit von Frankonit. Das Galvanometer ergab einen Ausschlag von 34 mm, was einem Ausschlagwerte von 6,8 mm je γ Aneurin entspricht.

Nunmehr war mithin bekannt, dass:

1. bei direkter Oxydierung einer reinen Aneurinlösung, also ohne Adsorption an Frankonit, der Ausschlag des Galvanometers für 1 γ B_1 6,8 mm ist;

2. bei Oxydierung von 100 mg Milch-Frankonit (siehe bei Milch) der Ausschlag des Galvanometers wohl nahezu proportional der Menge Vitamin ist, und zwar auf der Basis 1 γ B_1 = 5 mm.

3. bei Gebrauch von 50 mg Mehl-Frankonit der Ausschlag grösser als die Hälfte des bei Oxydierung von 100 mg Mehl-Frankonits erhaltenen Ausschlages ist; (bei 100 mg beträgt derselbe 4 mm, bei 50 mg 3,4 mm je γ B_1).

Danach wurden Portionen eines Milch-Frankonits von 50, 100 und 200 mg oxydiert. Die entsprechenden Ausschläge betrugen 13, 24 und 37½ mm und liessen also ein stetiges Zunehmen der Abweichung von dem theoretischen Verhältnis 1 : 2 : 4 erkennen.

Um einen deutlichen Einblick in die Ursache dieser Abweichung zu erlangen, müssen wir versuchen, eine Antwort auf die drei folgenden Fragen zu geben:

a. Wie verläuft die Proportionalität bei steigenden Aneurinmengen, bei Bestimmung ohne Adsorption an Frankonit?

b. Wie gestaltet sich die Proportionalität bei Oxydierung einer konstanten Menge Frankonit, an welche steigende Mengen Aneurin adsorbiert sind?

c. Wie verläuft die Proportionalität, wenn konstante Mengen Aneurin, adsorbiert an steigende Mengen Frankonit, oxydiert werden?

Um eine Antwort auf diese drei Fragen zu erlangen, wurden die folgenden Versuche angestellt:

Es wurden nacheinander in je einem Versuch 5, 10 und 15 γ Aneurin in 2 ccm Methanol in der üblichen Weise oxydiert. Die Ausschläge des Galvanometers waren bezw. 34, 67 und 102 mm, welche Werte Ausschlägen von bezw. 6,8 mm, 6,7 mm und 6,8 mm je γ Aneurin entsprechen.

Zu drei Portionen Wasser von je 800 ccm von einem $p_H = 3$ wurden bezw. 50 γ, 100 γ und 150 γ Aneurin hinzugefügt, und danach wurde jeder Portion 1 g Frankonit zugesetzt. Nachdem dieses letztere in üblicher Weise behandelt war und Portionen von 50 mg oxydiert worden waren, wurden folgende Resultate erhalten:

Erster	Versuch:	$2^1/_2\gamma$ B_1	bewirken einen	Ausschlag von	14 mm	$1\gamma = 5.6$ mm
Zweiter	Versuch:	5 γ B_1	„	„	27 mm	$1\gamma = 5.4$ mm
Dritter	Versuch:	$7^1/_2\gamma$ B_1	„	„	41 mm	$1\gamma = 5.5$ mm
			durchschnittlich für Oxydierung von 50 mg:			$1\gamma = 5.5$ mm

Bei Oxydierung von 100 mg Frankonit waren die Ausschläge:

Erster	Versuch:	5γ B_1	bewirken einen	Ausschlag von	24 mm	$1\gamma = 4.8$ mm
Zweiter	Versuch:	10γ B_1	„	„	48 mm	$1\gamma = 4.8$ mm
Dritter	Versuch:	15γ B_1	„	„	74 mm	$1\gamma = 4.9$ mm
			durchschnittlich für Oxydierung von 100 mg:			$1\gamma = 4.8$ mm

Bei Oxydierung von 200 mg Frankonit waren die Ausschläge:

Erster Versuch: 10γ B_1 bewirken einen Ausschlag von 40 mm 1γ = 4.0 mm
Zweiter Versuch: 20γ B_1 „ „ „ „ 76 mm 1γ = 3.8 mm
Dritter Versuch: 30γ B_1 „ „ „ „ 115 mm 1γ = 3.8 mm

durchschnittlich für Oxydierung von 200 mg: 1γ = 3.9 mm

Danach wurden dieselben Versuche mit Milch angestellt, welcher Aneurin in wechselnden Mengen zugesetzt war. Wegen des verhältnismässig geringen Aneuringehaltes von Milch ist eine direkte Bestimmung, also eine solche ohne Adsorption an Frankonit, nicht möglich. Es wurden folgende Daten erhalten:

Erster Versuch: 200 ccm Milch + 600 ccm Wasser + 1 g Frankonit.

Oxydierung von 50 mg ergab einen Ausschlag (über die Blankobestimmung) von 12 m
„ „ 100 mg „ „ „ („ „ „) „ 22 m
„ „ 200 mg „ „ „ („ „ „) „ 33 m

Zweiter Versuch: 200 ccm Milch + 600 ccm Wasser + 50 γ B_1 + 1 g Frankoni

Oxydierung von 50 mg ergab einen Ausschlag von 26 mm = 12 + 14 mm 1γ = 5.6 m
„ „ 100 mg „ „ „ „ 48 mm = 22 + 26 mm 1γ = 5.2 m
„ „ 200 mg „ „ „ „ 76 mm = 33 + 43 mm 1γ = 4.3 m

Dritter Versuch: 200 ccm Milch + 600 ccm Wasser + 100 γ B_1 + 1 g Frankoni

Oxydierung von 50 mg ergab einen Ausschlag von 40 mm = 12 + 28 mm 1γ = 5.6 m
„ „ 100 mg „ „ „ „ 71 mm = 22 + 49 mm 1γ = 4.9 m
„ „ 200 mg „ „ „ „ 118 mm = 33 + 85 mm 1γ = 4.2 m

Vierter Versuch: 200 ccm Milch + 600 ccm Wasser + 150 γ B_1 + 1 g Frankoni

Oxydierung von 50 mg ergab einen Ausschlag von 51 mm = 12 + 39 mm 1γ = 5.2 m
„ „ 100 mg „ „ „ „ 93 mm = 22 + 71 mm 1γ = 4.8 m
„ „ 200 mg „ „ „ „ 137 mm = 33 + 104 mm 1γ = 3.5 m

Hieraus folgt, dass bei Oxydation von Milchfrankonit:

50 mg bei zunehmenden Mengen Aneurin für 1γ Ausschläge von 5.6, 5.6 und 5.2 mm ergeben
100 mg „ „ „ „ „ 1γ „ „ 5.2, 4.9 und 4.8 mm „
200 mg „ „ „ „ „ 1γ „ „ 4.3, 4.2 und 3.5 mm „

Alle diese Ausschläge sind korrigiert auf einem Ausschlag für die Standard-Chininlösung von 80 mm.

Aus den hier beschriebenen Versuchen können die folgenden Schlüsse gezogen werden:

1. Bei direkten Aneurinbestimmungen, also ohne vorangehende Adsorption an Frankonit ist der Ausschlag des Galvanometers der

Menge Aneurin proportional. Dies ist für Ausschläge bis zu 100 mm kontrolliert.

2. Wenn 50 mg aktiviertes Frankonit oxydiert werden, dann besteht Proportionalität zwischen der Menge Aneurin und dem Ausschlage des Galvanometers. Bei 200 mg sinkt jedoch der Ausschlag je γ B_1 um zunehmende Werte. Diese sinkende Tendenz ist bei 100 mg nur noch gering.

3. Wenn dieselbe Menge Aneurin, adsorbiert an zunehmende Mengen Frankonit, oxydiert wird, dann sinkt der Ausschlag je γ Aneurin umsomehr, je mehr Frankonit vorhanden ist.

Offenbar geht vom Frankonit irgend eine hemmende Wirkung aus. Im folgenden Paragraphen wird versucht werden, die Art dieser Hemmung zu ermitteln.

§ 5. Untersuchung nach der Ursache des Einflusses der Frankonitmenge auf dif Resultate der Aneurinbestimmung.

Anfangs wurde angenommen, dass durch die Vergrösserung der Menge Frankonit bei der Oxydation die Umwandlung von Aneurin in Thiochrom weniger flott verlaufen werde. Daher wurde noch einmal genau untersucht, ob durch eine richtige Wahl der Menge Kaliumferricyanid die relative Abnahme der Grösse des Ausschlages des Galvanometers bei Oxydierung von 100 mg Frankonit im Vergleich zu dem Ausschlag bei Oxydation von 50 mg nicht vermieden werden könnte.

Oxydiert wurde mit 0,1 bis 2,5 ccm 1 %-igem Blutlaugensalz, jedoch ohne Resultat.

Auch Verlängerung der Oxydationszeit bewirkte keine Verbesserung. Vielmehr war dabei eher eine Abnahme als eine Zunahme des Ausschlages zu konstatieren.

Es wäre auch noch möglich, dass das Aneurin nicht quantitativ von der vergrösserten Frankonitmenge eluiert werden könnte. Um dies zu ermitteln, wurde die Bestimmung mit einer grösseren Menge Lauge ausgeführt. Vergrösserung der Laugenmenge ergibt jedoch auch eher einen niedrigen als einen höheren Ausschlag.

Nunmehr wurde eine Reihe Bestimmungen ausgeführt, bei welchen nicht nur die Menge aktivierten Frankonits, sondern diejenige aller Reagenzien verdoppelt wurde:

1) 50 mg Frankonit + 2 ccm Methanol + 1 ccm Lauge + 0,4 ccm Blutlaugensalz + 2 ccm Wasser + 13 ccm Isobutanol. Der Ausschlag des Galvanometers war 37 mm.

2) 100 mg Frankonit + dieselbe Menge Chemikalien.
Der Ausschlag des Galvanometers war 56 mm.

3) 100 mg Frankonit + doppelte Menge aller Reagenzien.
Der Ausschlag des Galvanometers war 35 mm.

4) 200 mg Frankonit + 2 ccm Methanol + 1 ccm Lauge + 0,6 ccm Blutlaugensalz + 2 ccm Wasser + 13 ccm Isobutanol.
Der Ausschlag des Galvanometers war 81 mm.

5) 200 mg Frankonit + doppelte Mengen aller Reagenzien.
Der Ausschlag des Galvanometers war 53 mm.

Bei Vergleichung dieser Ziffern zeigt sich, dass der Ausschlag von 3) grösser ist als die Hälfte desjenigen von 2), und nahezu gleich demjenigen von 1) geworden ist. Der Ausschlag von 5) ist grösser als die Hälfte desjenigen von 4) und ungefähr gleich demjenigen von 2).

Hieraus folgt also, dass der relative Unterschied in den Resultaten, der besteht, wenn wir 50 und 100 oder 100 und 200 mg aktiviertes Frankonit oxydieren, verschwindet, wenn die Mengen aller Chemikalien verdoppelt werden. Da bereits gefunden war, dass die Mengen Lauge und Blutlaugensalz keinen Einfluss auf die Messung ausüben, lag es auf der Hand, die konstatierte Abweichung auf die Menge Isobutanol zurückzuführen. Und in der Tat: als die obenbeschriebenen Versuche wiederholt wurden, doch jetzt allein mit Verdoppelung der Menge Isobutanol, zeigte sich, dass die Resultate, obwohl weniger prononziert, zu demselben Schluss führten. Ich fand nämlich, dass in diesem Fall der Ausschlag des Galvanometers statt der bei Versuch 5) gefundenen 53 mm, 49 mm betrug. Wenn die Verdopplung der Menge Isobutanol allein eine dementsprechende Konzentrationsveränderung herbeiführen würde, dann hätte der Ausschlag die Hälfte von 81 mm (Versuch 4) = 40 mm sein müssen.

Die Verdoppelung aller Mengen Chemikalien, ausser derjenigen des Isobutanols, bewirkte keine Verbesserung der Resultate.

Aus diesen Daten kann also der Schluss gezogen werden, dass wenn von einer Menge aktivierten Frankonits 50 bezw. 100 mg oxydiert werden, auch die Menge Isobutanol verdoppelt werden müsste, wenn man schliessende Resultate erhalten will.

Die nunmehr beschriebene Reihe Erscheinungen kann nur durch die Annahme erklärt werden, dass unter den Umständen, wie

diese sich bei der Ausführung des Versuches ergeben, das gebildete Thiochrom zu einem Teile an das Frankonit adsorbiert wird. Dann wird von einer bestimmten Menge Thiochrom von 100 mg Frankonit mehr absorbiert als von 50 mg und es wird bei 100 mg also ein niedrigerer Ausschlag des Galvanometers gefunden. Dass diese Hypothese richtig ist, zeigt sich aus den folgenden Versuchen.

a) Sowohl eine wässerige als eine alkoholische Lösung von Thiochrom wird mit 50 mg Frankonit geschüttelt. Keine beider Lösungen fluoreszierte mehr. Das Thiochrom wird also in neutraler Lösung durch Frankonit quantitativ aus Wasser und Isobutanol adsorbiert.

b) Das Frankonit der alkoholischen Lösung wurde nun mit 10 ccm 10 %-iger NaOH geschüttelt, wobei das Thiochrom teilweise eluiert wurde. Die Flüssigkeit ergab im Fluorometer einen Ausschlag von 20 mm. Das abzentrifugierte Frankonit wurde aufs neue mit 10 ccm 10 %-iger NaOH behandelt; die wässerige Schicht ergab einen Ausschlag von 5 mm, woraus also folgt, dass in 10 %-iger Lauge das Frankonit noch einen Teil des Thiochroms adsorbiert.

c) Die erste Röhre mit Lauge, die 20 mm Ausschlag ergab, wurde aufs neue mit 50 mm Frankonit geschüttelt; danach sank der Galvanometerausschlag bis auf 13 mm.

d) Eine Lösung, die dadurch erhalten war, direkt ein wenig Thiochrom in 10 ccm 10 %-iger NaOH aufzulösen, ergab einen Ausschlag von 70 mm. Nach Schütteln mit 50 mg Frankonit betrug der Ausschlag nur noch 50 mm.

Die Versuche b, c und d lehren uns, dass in alkalischem Milieu (10 % NaOH) das Thiochrom an 50 mg Frankonit in einem Prozentsatz von etwa 30 % adsorbiert wird.

Nach diesen orientierenden Versuchen lag es auf der Hand, die Adsorption des Thiochroms an Frankonit bei den Verhältnissen des Versuches selbst zu verfolgen. Zu diesem Zwecke wurde ein Frankonitpräparat von einer Lösung von reinem Aneurin in Wasser hergestellt. Von diesem Frankonit wurden 50 mg in der üblichen Weise oxydiert. Die Isobutanolschicht ergab einen Ausschlag von 43 mm. Sie wurde mit 50 mg Frankonit geschüttelt, wodurch der Ausschlag von 43 auf 39 mm sank, d.i. eine Abnahme von 10 %, was also viel weniger ist als bei den Versuchen a bis einschliesslich d. Dies kann natürlich dadurch verursacht

werden, dass das Isobutanol in diesem letzteren Fall noch Chemikalien von der Oxydation enthält. An erster Stelle kommt hierfür das Methanol in Betracht.

Um die Wirkung des Methanols zu verfolgen, wurden einer Thiochromlösung in Isobutanol steigende Mengen (0,1—1,0 ccm) Methanol hinzugefügt und das Ganze danach mit Frankonit geschüttelt. Wieder wurde alles Aneurin adsorbiert, sodass Methanol alleine nicht imstande ist, der Adsorption von Thiochrom an Frankonit entgegenzuwirken. Nur bei Anwesenheit von Lauge übt es seine adsorptionsverdrängende Wirkung aus.

Auf Grund der Erwägung, dass die Alkalität des Milieus von ausschlaggebendem Einfluss ist, doch dass die hinzugefügte Lauge sich nicht mit der Isobutanolschicht vermischt, wurde beschlossen, Pyridin hinzuzusetzen; diese Base vermischt sich wohl mit Alkohol, sodass hiervon eine die Adsorption beschränkende Wirkung erwartet werden konnte.

Wurden zu 10 ccm einer Thiochromlösung in Isobutanol 1 ccm Pyridin und 200 mg Frankonit hinzugesetzt, dann wurde alles Thiochrom adsorbiert. Mit 5 ccm Pyridin wurde jedoch nur 40 % adsorbiert.

Es lag auf der Hand, diese Verbesserung gemeinsam mit dem Gebrauch von Lauge anzuwenden. Zu diesem Zwecke wurden zwei Portionen von 200 mg aktiviertes Frankonit in der gewöhnlichen Weise oxydiert. Die Ausschläge für die 10 ccm Isobutanol betrugen bezw. 87 und 86 mm. Der ersten Menge wurden 2 ccm Wasser + 1 ccm Lauge + 2 ccm Methanol zugesetzt; nach Trennung der beiden Flüssigkeitsschichten ist der Ausschlag der Isobutanolschicht 62 mm; nach Adsorption an 200 mg neues Frankonit sinkt dieser bis 42 mm, das ist 33 %.

Der Portion in der zweiten Röhre wurden 2 ccm Wasser + 1 ccm Lauge + 2 ccm Methanol + 1 ccm Pyridin zugesetzt; nach Trennung der Flüssigkeitsschichten betrug der Ausschlag der alkoholischen Schicht 61 mm; nach Adsorption an 200 mg Frankonit sank dieser bis 53 mm, das ist nur 13 %. Da laut der auf S. 21 und gegebenen Ziffern die Verminderung des Ausschlages doch bereits 30 % betrug, stellt dies eine ansehnliche Verbesserung dar.

Nunmehr wurden bezw. 50 und 200 mg aktiviertes Frankonit oxydiert und ausserdem wurde 1 ccm Pyridin hinzugefügt. Die Ausschläge waren bezw. 35 und 109 mm, sodass das Defizit $4 \times 35 - 109 = 31$ mm oder 22 % betrug. Mit 3 ccm Pyridin waren

die Ausschläge bezw. 36 und 118 mm, was ein Defizit von 18 % bedeutet.

Es gelang nicht, die Ergebnisse durch Steigern der Pyridinmenge noch weiter zu verbessern. Wurden mehr als 3 ccm zugesetzt, dann färbte sich die Isobutanolschicht gelb, da sich das Blutlaugensalz in der Mischung Butanol-Pyridin auflöste, welcher Umstand die Bestimmung natürlich unmöglich machte.

Daher wurde versucht, ob ein anderer Stoff brauchbarer sein werde. Zunächst wurde ein Versuch mit Tri-Äthanolamin gemacht, einer sirupartigen, mit Wasser und Isobutanol mischbaren Flüssigkeit. Hier zeigte sich jedoch, dass die Gelbfärbung der Isobutanolschicht durch das Lösen des Blutlaugensalzes in ihr, noch eher auftrat als bei Pyridin.

Die Verwendung der Base Trimethylamin hatte ebensowenig Erfolg.

Nunmehr wurde ein anderes Verfahren versucht. Es musste nämlich möglich sein, das bei der Oxydation von aktiviertem Frankonit entstandene Thiochrom durch eine erneute Adsorption an eine zweite Portion Frankonit von allen störenden Reagenzien zu befreien, deren wichtigste wohl das Kaliumferricyanid ist.

Für das Ausführen orientierender Versuche wurden zunächst 20 g eines Mischmusters aktiviertes Frankonit mit 200 ccm Methanol, 100 ccm 30 %-iger Lauge und 50 ccm Blutlaugensalz oxydiert. Danach wurde das Frankonit abzentrifugiert und die darüberstehende klare Lösung in Wasser ausgegossen, das hiernach auf einen $p_H = 3$ gebracht wurde.

Zu dieser Thiochromlösung wurden 10 g Frankonit hinzugesetzt, wodurch das Thiochrom quantitativ adsorbiert wurde. Das Frankonit färbte sich grün infolge des Umstandes, dass das Frankonit noch Eisen enthält und dieses Eisen mit dem Kaliumferricyanid komplexe Eisencyanide bildet.

Das hinzugefügte Frankonit wurde abzentrifugiert und mit Alkohol nachgewaschen, getrocknet und zu einem homogenen Muster gemischt.

Von diesem grünen Frankonit wurden 50 mg mit 1 ccm 30 %-iger Lauge + 13 ccm Isobutanol behandelt und danach wurde abzentrifugiert. Die Fluoroszenz des Isobutanols betrug 8 mm.

Nunmehr mussten also wieder die mit 50 und 200 mg erhaltenen Ausschläge dieses Frankonits verglichen, und der eventuelle Einfluss von Pyridin darauf verfolgt werden.

Aus einem vorläufigen Versuch erhellte, dass Pyridin allein

nicht imstande war, das Thiochrom von dem Frankonit zu eluieren; erst als auch Lauge hinzugesetzt wurde, begann die Flüssigkeit zu fluoreszieren.

Von dem durch Thiochrom aktivierten Frankonit wurden nunmehr bezw. 50 und 200 mg folgendermassen behandelt:

50 mg + 13 ccm Isobutanol + 4 ccm Pyridin + 4 ccm 30 %-iger Lauge. Ausschlag 13 mm
200 „ + 13 „ „ + 4 „ „ + 4 „ „ „ . „ 45 „

Das Defizit betrug also noch $4 \times 13 - 45 = 7$ mm $= 13$ %.

Dieses gute Resultat war jedoch dadurch erhalten, dass die eigentliche Bestimmungsmethode in verschiedenen Stufen ausgeführt und für jedes Stadium die geeignetsten Verhältnisse gewählt wurden; dem stand aber gegenüber, dass die Methode kompliziert und langwierig geworden war. Die Furcht, dass dadurch anderseits Verluste an Thiochrom erlitten wurden, welche den anfänglich durch die theoretisch richtigere Arbeitsweise erzielten Gewinn weit übertreffen würden, erwies sich als begründet, als eine Bestimmung als Ganzes ausgeführt wurde.

In 1½ Liter Wasser von einem $p_H = 3$ wurden 300 γ Aneurin an 3 g Frankonit adsorbiert. Von diesem aktivierten Frankonit wurden 50 mg mit 2 ccm Methanol, 1 ccm 30 %-iger Lauge und 0,2 ccm 1 %-igem Blutlaugensalz oxydiert. Nach Abzentrifugieren wurde die darüberstehende Flüssigkeit in 25 ccm Wasser ausgegossen, dem 5 ccm 10 %-iges HCl hinzugefügt wurde.

Das bereits behandelte und abzentrifugierte Frankonit wurde noch einmal in derselben Weise oxydiert, um auch das eventuell noch adsorbiert gebliebene Aneurin oder Thiochrom zu entfernen. Nach Abzentrifugieren wurde die darüberstehende Flüssigkeitsschicht wieder in dieselbe Portion Wasser ausgegossen.

Diesem Gemische wurden danach 50 mg neues Frankonit hinzugesetzt; nach Abzentrifugieren und Auswaschen wurden diese 50 mg mit 13 ccm Isobutanol, 2 ccm Pyridin und 4 ccm Lauge behandelt. Der Ausschlag des Galvanometers betrug nur 9 mm, statt der berechneten 25 mm. Die Methode ist also auf diese Weise völlig unbrauchbar.

Es schien mir unverständig, mit dem Suchen nach einer Methode, den scheinbaren Gegensatz in den Ausschlägen, der bei der Bearbeitung verschiedener Mengen aktivierten Frankonits erhalten wurde, fortzufahren. Die in diesem Paragraphen beschriebene Versuchsreihe hat die Erkenntnis gebracht, dass die Tatsache berücksichtigt werden muss, dass das Frankonit einen

Teil des Thiochroms adsorbiert hält. Wenn wir uns jedoch darauf beschränken, immer dieselbe Menge Frankonit zu verarbeiten, wofür sich 50 mg als die geeignetste Menge erwiesen hat, dann brauchen wir nicht zu fürchten, fehlerhafte Resultate zu erhalten, da sich doch auch gezeigt hat, dass in diesem Falle die Ausschläge des Galvanometers proportional der anwesenden Menge Aneurin verlaufen.

§ 6. Die Abhängigkeit des Ausschlages je γ Aneurin von der Art des untersuchten Produktes.

Auf Grund der in § 5 gemachten Erfahrung wurde beschlossen, hinfort alle Bestimmungen mit 50 mg aktiviertem Frankonit vorzunehmen. In § 4 wurde gefunden, dass der Ausschlag des Galvanometers, berechnet auf einen Ausschlag für die Standard-Chininlösung von 75 mm, für 1 γ Aneurin 5,6 mm beträgt. Für Milch wurde 5,5 mm gefunden. Westenbrink und Goudsmit (26) hatten bei ihren mit 100 mg aktiviertem Frankonit ausgeführten Bestimmungen in Harn einen Ausschlag von 5 mm erhalten. Bei Oxydierung von 50 mg Frankonit fand ich dafür einen Ausschlag von 5,4 mm je γ. Diese Ziffern stimmen also gut miteinander überein.

Anders gestaltete sich die Sachlage aber, als Getreidearten auf ihren Aneuringehalt untersucht wurden. Wie in dem diesbezüglichen Teile dieser Dissertation beschrieben werden wird, konnte eine zu Weizenextrakt hinzugefügte Menge Aneurin nicht quantitativ wiedergefunden werden; nach Hinzufügung von 100 γ ergab das Galvanometer einen Ausschlag, der einer Menge von 75 γ entsprach. Es zeigte sich aber die merkwürdige Erscheinung dass nicht allein von den hinzugefügten 100 γ 75 γ wiedergefunden wurden, sondern von jeder beliebigen Menge derselbe Prozentsatz: 75 %.

Noch sonderbarer wurde die Situation bei Untersuchung von Roggenextrakt. Hier wurden von den hinzugefügten 100 γ Aneurin nur 45 % wiedergefunden; doch auch hier zeigte sich, dass der Verlust von 55 % immer ein konstanter Prozentsatz der gesamten hinzugefügten Menge war. Wurden dieselben Versuche mit Gersten- oder Maisextrakt angestellt, dann betrug der konstante Verlust etwa 45 %.

Es ist jedoch nicht notwendig, diese Erscheinung als einen Verlust zu sehen. Wir basierten diesen scheinbaren Verlust auf die

bisher gefundene Tatsache, dass 1 γ Aneurin, adsorbiert an 50 mg Frankonit und dann zu Thiochrom oxydiert, einen Ausschlag von 5,5 mm ergibt. Wir haben diesen Faktor dadurch bestimmt, dass wir von einer bekannten Menge Aneurin ausgingen und für diese Menge den Ausschlag des Galvanometers bestimmten. Ein einfaches Umrechnen lehrt uns dann, dass wir für jedes γ hinzugefügtes Aneurin einen Galvanometerausschlag von 5,5 mm erhalten. Wir wissen auch, dass ungefähr 10 % des Thiochroms an das Frankonit adsorbiert bleibt, sodass infolgedessen auch schon ein Verlust von 10 % eintritt. Was dies betrifft, können wir also gewiss nicht sagen, dass alles hinzugefügte Aneurin quantitativ in Thiochrom verwandelt und als solches gemessen wird.

Bestimmen wir nun den Ausschlag je γ Aneurin, wenn wir dieses zu Milch hinzufügen, dann bekommen wir in der Tat dasselbe Resultat. Auch hier ergibt jedes γ Aneurin einen Ausschlag von 5,4—5,5 mm.

Bestimmen wir jedoch den Ausschlag per γ Aneurin, wenn dieses zu Weizenextrakt hinzugefügt wird, dann finden wir dafür einen Ausschlag von 4,2 mm, für Roggenextrakt einen solchen von 2,6 mm, für Gerstenextrakt 2,8 mm und für Mais ebenfalls 2,8 mm. Als später noch andere Produkte untersucht wurden, stellte sich heraus, dass auch alle diese Produkte immer einen konstanten, doch nach der Art des Produktes wechselnden Ausschlag je γ Aneurin aufwiesen (siehe unten).

Jedes Produkt hat also seinen eigenen Ausschlag je γ Aneurin.

Welches kann die Ursache dieser Tatsache sein? Die erste Möglichkeit, die untersucht wurde, nämlich dass Milchfrankonit weniger Thiochrom adsorbieren werde als ein Roggen- oder ein Gerstenfrankonit, musste auf Grund des folgenden Versuches verworfen werden:

Reines Aneurin wurde an Frankonit adsorbiert; hiervon wurden zwei Portionen oxydiert. Die Ausschläge des Galvanometers waren bezw. 70 und 70 mm. Der ersten Röhre wurden nun 100 mg Milchfrankonit zugesetzt, der zweiten 100 mg Gerstenfrankonit. Nach Abzentrifugieren waren die Ausschläge bezw. 54 und 55 mm. Man kann also nicht sagen, dass Gerstenfrankonit mehr Thiochrom adsorbiert als Milchfrankonit.

Dann bleibt also nur die Hypothese übrig, dass in einem derartigen Frankonit Stoffe vorhanden sind, die entweder die

Oxydation des Aneurins oder die Messung der Intensität des Fluoreszenzlichtes von Thiochrom hemmen.

Sollte es sich um eine Hemmung der Oxydation des Aneurins handeln, dann wäre diese doch jedenfalls nicht durch eine richtigere Wahl der Menge Blutlaugensalz zu verhindern. Es wurden nämlich Portionen von 50 mg Gerstenfrankonit mit Mengen Blutlaugensalz oxydiert, die von 0,05 bis 2,5 ccm variierten. Der Maximalausschlag trat bei 0,4 bis 0,7 ccm Blutlaugensalz auf; dies ist also gleich der Menge, die bisher immer gebraucht wurde.

Darauf wurde untersucht, ob durch eine andere Wahl der Menge oder der Konzentration der Lauge einer eventuell verminderten Elution von Aneurin vom Frankonit entgegengewirkt werden könne. Hierbei wurden Konzentrationen von 1 % bis 50 % und Mengen von ½ ccm bis 6 ccm versucht, jedoch ohne jeden Erfolg. Auch Elution mit Baryt ergab kein Resultat; die eluierende Wirkung desselben (1 ccm gesättigte Barytlösung + 100 mg fester Baryt) war viel geringer als diejenige der Lauge.

Dass verminderte Elution nicht die Ursache der Hemmung sein kann, sondern die Ursache in der Anwesenheit von Stoffen gesucht werden muss, die sich in dem Methanol und der Lauge, womit das aktivierte Frankonit behandelt wird, auflösen, wird durch den folgenden Versuch bewiesen, der mit Roggenfrankonit ausgeführt wurde.

500 mg Roggenfrankonit wurden mit 6 ccm Methanol und 3 ccm Lauge von 30 % behandelt. Nach Abzentrifugieren wurden folgende Manipulationen vorgenommen:

a. 3 ccm dieser Flüssigkeit wurden oxydiert und gemessen.

b. 3 ccm derselben Flüssigkeit wurden mit 0,1 ccm einer Aneurinlösung vereinigt, gemeinsam mit dieser oxydiert und gemessen.

c. 0,1 ccm derselben Aneurinlösung wurden in der üblichen Weise mit 2 ccm Methanol + 1 ccm Lauge + Blutlaugensalz oxydiert und gemessen.

Die Ausschläge dieser drei Bestimmungen betrugen bezw. 44, 77 und 57 mm.

Wird also eine Aneurinlösung, die, in der üblichen Weise oxydiert, einen Ausschlag von 57 mm ergibt (c), mit Lauge und Methanol behandelt, die eine derartige Menge Aneurin enthalten, dass der Ausschlag nach dessen Oxydierung 44 mm (a) betragen würde, dann ist der Gesamtausschlag nicht 57 + 44 = 101 mm, sondern nur 77 mm (b).

Um sicher zu sein, dass vorstehender Gedankengang richtig ist, wurde der Versuch noch einmal ausgeführt, aber diesmal folgendermassen: Es wurden 0,3 ccm Aneurinlösung + 6 ccm Methanol + Lauge erniedrigt also den Ausschlag für 1 γ Aneurin.

a. 3 ccm oxydiert und gemessen;

b. 3 ccm + 0,1 ccm Aneurinlösung oxydiert und gemessen;

c. 0,1 ccm dieser Aneurinlösung oxydiert und gemessen.

Die Ausschläge waren jetzt bezw. 51,105 und 56 mm, sodass gefunden ward: 51 + 56 = 107 mm gegen 105 mm, was also wohl miteinander übereinstimmt.

Die Verwendung von durch Roggenfrankonit aktiviertem Methanol + Lauge, erniedrigt also den Ausschlag für 1 γ Aneurin.

Nunmehr galt es noch, die Möglichkeit zu untersuchen, ob in der Butanolschicht sich Stoffe lösen, die die Fluoreszenzintensität vermindern. Um dies zu ermitteln, wurden 50 mg von einem durch reines Aneurin aktivierten Frankonit in der üblichen Weise oxydiert. Das Galvanometer ergab hierfür einen Ausschlag von 41 mm.

Darauf wurden 50 mg Roggenfrankonit oxydiert. Der Ausschlag hierfür betrug 20 mm. Als beide Isobutanolmengen gemischt waren und der Ausschlag des Mischmusters gemessen wurde, zeigte sich, dass dieser Ausschlag nicht, entsprechend der Erwartung, 30 mm betrug, sondern nur 26 mm. Dies will besagen, dass die von dem Roggenfrankonit herrührende Butanolschicht die von dem reinen Frankonit herrührende Fluoreszenz in ungünstigem Sinne beeinflusst.

Ich möchte dies so formulieren, dass im Roggenextrakt Stoffe vorkommen, die an das Frankonit adsorbiert werden und später in die Butanolschicht hineingeraten und die Fluoreszenz des Thiochroms vermindern. Dadurch wird es denn auch erklärlich, dass für 1 γ Aneurin im Roggenextrakt ein niedrigerer Ausschlag des Galvanometers gefunden wird als für reines Aneurin.

Da sich im Laufe der Untersuchung gezeigt hat, dass der Ausschlag je γ Aneurin für jedes Produkt verschieden ist, können wir somit im allgemeinen sagen, dass die Grösse des Ausschlages je γ Aneurin für ein bestimmtes Produkt durch die Anwesenheit gewisser Stoffe bedingt wird, deren Art indessen noch nicht bestimmt werden konnte.

Es wurde auf verschiedene Weise versucht, diese störenden Stoffe aus den Extrakten zu entfernen. Zunächst wurde untersucht, ob dieselben in dem angesäuerten Extrakt nicht mit $KMnO_4$

oxydiert werden könnten; doch hierfür war erst erforderlich, zu wissen, wie sich das Aneurin unter diesen Umständen verhalten werde. Nur wenn dasselbe gegen die Oxydation mit $KMnO_4$ in saurem Milieu beständig sein würde, könnte die Methode sich als brauchbar erweisen. Ersteres war in der Tat der Fall.

Nun wurde der Versuch mit Roggenextrakt ausgeführt. 750 ccm von diesem wurden mit verdünntem $KMnO_4$ oxydiert, bis die Farbe desselben gerade ganz verschwunden war. Danach wurden 600 mg Frankonit hinzugefügt.

Einer zweiten Portion Roggenextrakt von 750 ccm wurden 100 γ Aneurin hinzugefügt und, nach Oxydierung mit Permanganat, auch wieder 600 mg Frankonit. Von beiden Portionen Frankonit wurden 50 mg oxydiert. Die Ausschläge betrugen bezw. 14 und 30 mm; das ist also ein Unterschied von 16 mm. An die 50 mg Frankonit waren bei der zweiten Bestimmung 100 : 12 = $8^1/_3$ γ Aneurin mehr adsorbiert, was einen Ausschlag erwarten liess, der wenigstens $8^1/_3$ mal 2,6 = 22 mm grösser sein werde als bei der ersten Bestimmung. Da wir nun aber faktisch einen nur um 16 mm grösseren Ausschlag fanden, ist das Resultat mithin noch ungünstiger als ohne die Oxydierung.

Da reines Aneurin wohl gegen $KMnO_4$ beständig ist, scheint hier ein Fall induzierter Oxydation vorzuliegen.

Darauf wurde noch eine Reinigung durch Adsorption an Norit, aus einem Liter Roggenextrakt, dem 1 Liter 96 %-iger Alkohol und 10 ccm 38 %-iges HCl hinzugefügt waren, versucht. Unter diesen Umständen wird Aneurin nicht an Norit adsorbiert; doch es liess sich auch keine Verbesserung in den Ausschlägen konstatieren; der Ausschlag blieb 2,5 mm je γ Aneurin.

Um einer möglichen Schwermetall-Katalyse, welche Aneurin vielleicht zu anderen Stoffen als Thiochrom oxydieren könnte, entgegenzuwirken, wurde der Extrakt nicht mit Schwefelsäure, sondern mit Phosphorsäure auf ein p_H = 3 gebracht. Die eine Hälfte des so erhaltenen Extraktes (750 ccm) wurde direkt mit Frankonit behandelt; die andere Hälfte wurde erst mit $KMnO_4$ oxydiert. Wurde derselbe Versuch nach Hinzufügung von 100 γ Aneurin ausgeführt, dann wurden aber dieselben Ziffern erhalten wie immer.

Auch wurde noch eine Reinigung mit Pb-Azetat und Schwefelwasserstoff versucht; doch auch hierdurch wurde keine Besserung erzielt. Ebenso blieb ein Versuch, eine Reinigung mit $AgNO_3$ +

HCl zu bewirken, erfolglos, und auch ein Verfahren, den Extrakt mit Äther auszusschütteln, misslang.

Es ist somit auf keine Weise gelungen, die störenden Stoffe, die für den niedrigen Ausschlag für 1 γ Aneurin in Roggenextrakt verantwortlich sind, ohne Verlust an Aneurin zu entfernen. Dass es jedoch wohl fraglos derartige störende Stoffe gibt, beweisen die folgenden Versuche:

1. 800 ccm Gerstenextrakt wurden mit 500 mg Frankonit behandelt; wenn von diesem aktivierten Frankonit 50 mg oxydiert wurden, dann war der Ausschlag des Galvanometers 35 mm.

2. Zu 800 ccm desselben Gerstenextraktes wurden 100 γ Aneurin und danach 500 mg Frankonit hinzugefügt; Oxydierung von 50 mg dieses Frankonits ergab einen Ausschlag von 61 mm, d.i. 26 mm mehr für 10 γ.

3. 800 ccm desselben Gerstenextraktes wurden mit $KMnO_4$ in schwefelsaurem Milieu solange oxydiert, bis die Farbe nur noch langsam verschwand. Zu der einen Hälfte wurden direkt 250 mg Frankonit hinzugefügt, zu der anderen Hälfte erst 50 γ Aneurin und danach wieder 250 mg Frankonit. Nach Oxydierung von 50 mg von beiden Portionen Frankonit betrug der Ausschlag bezw. 17 und 53 mm.

Bei Vergleichung des Versuches 1 mit Versuch 2 zeigt sich, dass der Unterschied im Ausschlag für 10 γ Aneurin 26 mm beträgt.

Der dritte Versuch lehrt uns, dass der Ausschlag von 50 mg Frankonit, das durch den oxydierten Extrakt aktiviert ist, nur 17 mm beträgt, statt 35 mm; (die halbe Menge Extrakt muss mit der halben Menge Frankonit dasselbe Resultat ergeben, wie bei den Versuchen 1 und 2). Bei der Oxydierung mit $KMnO_4$ ist, wie erwartet wurde, ein grosser Teil des Aneurins verlorengegangen; doch für die nach dieser Oxydation hinzugefügte Menge Aneurin wird für 10 γ ein Ausschlag von 53 — 17 = 36 mm gefunden oder für 1 γ Aneurin 3,6 mm.

Bedeutet dies schon eine ansehnliche Verbesserung, noch höher wird der Ausschlag, wenn der Gerstenextrakt noch stärker oxydiert wird. Lässt man z.B. 800 ccm Extrakt zwei Stunden mit einem Übermass $KMnO_4$ stehen und beseitigt man dieses Übermass mit einigen Tropfen H_2O_2, dann ergeben 10 γ Aneurin, die diesem Extrakt hinzugefügt werden, einen Ausschlag von 40 mm.

Praktischen Nutzen für die Bestimmung selbst haben diese Versuche jedoch nicht gebracht. Es ist noch nicht gelungen, die störenden Stoffe ganz zu entfernen, ohne dass das vorhandene

Aneurin, wenigstens zu einem Teile, verlorengeht. Es wird also hinfort erforderlich sein, für jedes Produkt zu bestimmen, wie gross der Ausschlag je γ Aneurin ist. Ein Grund, diese Versuche nicht trotzdem unentwegt fortzusetzen, braucht die gegenwärtige Sachlage nicht zu sein.

Kapitel II.

ANEURINBESTIMMUNGEN IN MILCH UND MILCHPULVER.

§ 1. Einleitung.

Wenn man aus der Literatur einen Eindruck von dem Aneuringehalt von Milch bekommen will, dann bemerkt man, dass die diesbezüglichen Angaben ziemlich voneinander abweichen.

Osborne und Mendel (27) teilten mit, dass ihre Ratten täglich 16 ccm Milch haben mussten, um normal zu wachsen.

Kennedy und Dutcher (28) konnten bei täglicher Verabfolgung von 10 ccm Milch noch kein Wachstum bemerken, sondern nur ein Konstantbleiben des Gewichtes; nach ihnen genügen 10 ccm je Tag nicht.

Outhouse, Macy, Brake und Graham (29) konnten sogar erst bei täglicher Verabfolgung von mindestens 25 ccm Milch ein normales Wachstum konstatieren.

Reyer (30) hat in Deutschland in den Jahren 1926—1928 eine ausgedehnte Untersuchung nach dem Vitamin B_1-Gehalt von Marktmilch angestellt. Er fand dabei noch niedrigere Werte als die vorgenannten amerikanischen Untersucher; nach ihm sollten 30 ccm Milch je Tag noch nicht ausreichen, der Avitaminose vorzubeugen.

Auch Hund und Krause (31) fanden nur geringe Mengen Aneurin in Milch.

Nach Samuel und Koch (32) sollen täglich 25 ccm zum Wachstum genügen, während De Caro und Speyer (33), schon bei 10 ccm Milch je Tag ein normales Wachstum konstatieren konnten.

Wenn wir als Grundlage nehmen, dass eine Ratte täglich etwa 5 γ Aneurin benötigt, dann müssten wir aus obigen Literatur-

angaben folgern, dass Milch 150—500 γ Vitamin B_1 je Liter enthalten werde. Obgleich es verlockend ist, extreme Werte auszuschalten und anzunehmen, dass ein Quantum Milch von etwa 20 ccm Milch als mittlere notwendige Menge 5 γ Vitamin B_1 enthalten werde, welche Ziffer einem Aneuringehalt von 250 γ je Liter entspricht, ist dieses Verfahren nicht gerechtfertigt. Unsere gegenwärtig noch unzulänglichen Kenntnisse aller eventuell nötigen Faktoren des Vitamin B-Komplexes lassen sehr wohl die Möglichkeit offen, dass die konstatierten Unterschiede nicht durch Unterschied im Aneuringehalt verursacht werden, sondern dem völligen oder teilweisen Fehlen oder Nicht-Fehlen dieser übrigen Faktoren zuzuschreiben sind.

§ 2. Ausarbeitung der Methode.

Laut der von Jansen gegebenen Vorschrift muss die Adsorption von Aneurin an Frankonit bei einem $p_H = 3$ geschehen. Bei der Untersuchung von Milch stand ich vor der Schwierigkeit, dass bei diesem p_H das Kasein ausflockt, sodass die Bestimmung unter diesen Umständen unausführbar ist. Ausserdem besteht die Möglichkeit, dass das Eiweiss einen Teil des Aneurins adsorbiert, wodurch Verluste entstehen könnten. Es galt also zunächst das Eiweiss zu entfernen.

Eine Behandlung mit Lauge ist für diesen Zweck nicht anwendbar, da das Aneurin in alkalischem Milieu nicht beständig ist. Somit blieb nur die Behandlung mit Säure übrig. Nun ist es in der Tat möglich, das Eiweiss durch Kochen mit Salzsäure zu zersetzen, und nach Filtrierung könnte das Aneurin aus dem Filtrat ohne weitere Schwierigkeiten an das Frankonit adsorbiert werden. Es war jedoch die Frage, ob das Aneurin, dessen Beständigkeit gegen verdünnte Säure bekannt ist, auch die ziemlich eingreifende Behandlung mit 15 %-iger Salzsäure wohl vertragen könnte. Das Zersetzen des Eiweisses geschieht nämlich in der Weise, dass eine dem betreffenden Zwecke angemessene Menge Milch zusammen mit einer gleich grossen Menge 30 %-iger Salzsäure eine Stunde lang gekocht wird. Es musste nun versucht werden, eine derartige Säurekonzentration zu finden, dass das Eiweiss noch gerade hinreichend zersetzt und das Aneurin gerade noch nicht angegriffen wird. Es zeigte sich mir, dass zum Erhalten einer Flüssigkeit, die sich leicht filtrieren lässt (was für einen flotten Verlauf der Analyse notwendig ist), die zunächst mit der gleichen Menge Wasser verdünnte Milch eine halbe Stunde

mit einer derartigen Menge Salzsäure gekocht werden muss, dass die Gesamtkonzentration der Flüssigkeit 5 % beträgt.

Nachdem 50 ccm Milch in der oben beschriebenen Weise mit Salzsäure behandelt worden war, wurde filtriert und das Filtrat auf ein $p_H = 3$ gebracht, worauf 1 g Frankonit hinzugefügt wurde. Nach einer im ersten Teile ausführlich beschriebenen Behandlung wurden schliesslich 100 mg dieses aktivierten Frankonits mit bezw. 0,2 und 0,4 ccm 1 %-igem Kaliumferricyanid oxydiert; die Isobutanolschicht fluoreszierte jedoch nicht, sodass kein Thiochrom gebildet war.

Das Aneurin ist also gegen längeres Kochen mit 5 % Salzsäure nicht beständig.

Nachdem die Versuche des Kochens der Milch mit Salzsäure also unbefriedigend verlaufen waren, suchte ich das Aneurin bei dem eigenen p_H der Milch (6,4—6,6) an das Frankonit zu adsorbieren. Um dasselbe leichter von der beim Abzentrifugieren gebildeten Fettschicht entfernen zu können, wurde die Milch erst durch Verdünnung mit Wasser auf das sechsfache Volumen gebracht. Ein zweiter Grund für das Verdünnen der Milch war die Erfahrung, welche Westenbrink und Goudsmit (26) bei der Untersuchung von Harn gemacht hatten, dass nämlich allein nach einer solchen Verdünnung alles Aneurin bei der letzten Messung wiedergefunden wurde.

Nachdem ein halbes Liter Milch mit Wasser bis auf drei Liter ergänzt worden war, wurde 1 g Frankonit zugesetzt und das Ganze einige Minuten gut umgerührt. Danach wurde das Frankonit abzentrifugiert, ausgewaschen und getrocknet.

Ungeachtet des starken Verdünnens konnte nicht verhindert werden, dass das Frankonit noch Fett adsorbiert hielt, sogar noch nach langem Auswaschen. Daher wurde das Frankonit nach dem Auswaschen mit Alkohol noch mit Äther behandelt. Von dem gut gemischten aktivierten Frankonit wurden nun Portionen von 50 mg mit bezw. 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 und 1,4 ccm 1 %-igem Kaliumferricyanid oxydiert, wobei Ausschläge von bezw. 25, 24, 25, 25 und 21 mm erhalten wurden.

Bei einem p_H von 6,4 wird also in der Tat Aneurin an Frankonit adsorbiert.

Danach blieb noch zu ermitteln, ob das Vitamin quantitativ adsorbiert und eine hinzugefügte Menge Aneurin quantitativ wiedergefunden wird. Zu diesem Zwecke wurden die folgenden Versuche angestellt:

1. 250 ccm Milch wurden bis zu 1 Liter verdünnt. Darauf wurde 1 g Frankonit hinzugefügt (1a). Nachdem dieses abzentrifugiert war, wurde die Milch nochmals mit 1 g Frankonit behandelt (1b). Von beiden Portionen wurden Mengen von 100 mg mit bezw. 0,4, 0,6 und 0,8 cmm 1 %-igem Kaliumferricyanid behandelt.

2. 250 ccm derselben Milch wurden bis zu 1 Liter verdünnt, und hierauf wurden 20 γ Aneurin zugesetzt. Des weiteren wurde ebenso wie bei Versuch 1 verfahren. Auch hier wurden wieder von beiden Portionen Frankonit (2a und 2b) 100 mg oxydiert.

3. Zu 250 ccm derselben Milch, die wieder bis zu 1 Liter verdünnt war, wurden 200 γ Aneurin hinzugefügt, und danach wurde ebenso wie bei Versuch 1 und 2 verfahren.

Diese Versuchsreihe ergab nun die folgenden Resultate:

	1^a	1^b	2^a	2^b	3^a	3^b
Ausschlag für die Blankobestimmung in mm	2	2	4	2	7	3
Ausschlag für die oxydierte Bestimmung in mm	33	6	45	7	123	16
Unterschied	31	4	41	5	116	13
Insgesamt	35		46		129	
Korrigiert	31		41		115	

Da anfänglich angenommen wurde, dass 1 γ Aneurin einen Ausschlag von 5 mm ergebe, (basiert auf einen Ausschlag der Chininlösung von 75 mm), bedeuteten diese Ausschläge von bezw. 31, 41 und 115 mm, dass bezw. 62 γ, 82 γ und 230 γ Aneurin vorhanden waren, sodass von den hinzugefügten Aneurinmengen (bezw. 20 γ und 200 γ) bezw. 22 γ und 168 γ wiedergefunden wurden.

Diese Ergebnisse führten zu folgenden Erwägungen:

1. Wenn die Adsorption von Aneurin aus Milch an Frankonit nicht bei einem p_H von 3 stattfindet, dann wird nicht alles Aneurin adsorbiert. Bei der Besprechung der Thiochrommethode wurde in § 4 bewiesen, dass unter den Umständen, unter welchen die Adsorption bei Milch ausgeführt wurde, immer 11—12 % der Gesamtmenge Aneurin in der Flüssigkeit zurückblieb. Auch aus den in obiger Tabelle zusammengefassten Resultaten erhellt, dass ungefähr 12 % des Aneurins nicht adsorbiert werden; (nämlich

31 + 4; 41 + 5; 116 + 13 mm). Dieser konstante Adsorptionskoeffizient bringt mit sich, dass nicht immer zweimal adsorbiert zu werden braucht, sondern dass man die bei der ersten Bestimmung erhaltenen Resultate nur um 12 % zu erhöhen braucht, um die richtigen Werte für den Aneuringehalt zu finden.

2. Bei der Bestimmung 1a betrug der Ausschlag des Galvanometers für die Blankobestimmung 2 mm; bei 2a war er 4 mm, und bei Bestimmung 3a war er auf 7 mm gestiegen. Bei einem idealen Verlauf der Bestimmung wäre dies nicht möglich gewesen, da ja immer von 250 ccm Milch ausgegangen wurde, sodass in jeder der drei Bestimmungen die Vorfluoreszenz gleich gross hätte sein müssen. Da dies nicht der Fall war, sondern der Ausschlag der Blankobestimmung langsam umsomehr stieg, je mehr Aneurin hinzugefügt war, musste ich wohl annehmen, dass auch ohne die Anwesenheit von Blutlaugensalz im alkalischen Milieu ein Teil des Aneurins in Thiochrom verwandelt wird. Diese Annahme wird noch durch zwei andere Tatsachen gestützt.

Die erste derselben ist, dass die Isobutanolschicht der Blankobestimmung von 1a (also diejenige der Milch, welcher kein extra Aneurin hinzugefügt ist), gelbgrün fluoresziert, während diejenige von 2a in sehr geringem Masse und diejenige von 3a in ziemlich starkem Masse blau fluoresziert. Die zweite Tatsache ist, dass, wenn man dieser Butanolschicht einen Tropfen starker Salzsäure zusetzt, die blaue Farbe verschwindet, und das Thiochrom auch nur in alkalischem Milieu fluoresziert. Nach diesem Ansäuern reagiert die Butanolschicht wieder gelbgrün. Ausserdem ist der Ausschlag 2—3 mm gesunken.

Diese Tatsachen rechtfertigen m. E. hinreichend den Schluss, dass, wenn die Blankobestimmung für ein Milchmuster — mit Zusatz von extra Aneurin — grösser als 3 mm ist, der über diese Grösse hinausgehende Ausschlag des Galvanometers auf Rechnung des Thiochroms geschrieben werden muss. Im Laufe der weiteren Untersuchung wurden hunderte Milchmuster untersucht; aber niemals wurde eine Blankobestimmung von mehr als 3 mm gefunden, wenigstens wenn kein Aneurin zugefügt war.

Dieser Umstand bringt mit sich, dass die Ausschläge der Versuche 1, 2 und 3 bezw. nicht 31, 41 und 115 mm sind, sondern dass 31, 42 und 119 mm angenommen werden muss, welche Ziffern Aneurinwerten von bezw. 62 γ, 84 γ und 238 γ entsprechen, sodass von den 20 γ, bezw. 200 γ hinzugefügtem Aneurin bezw. 22 γ und 176 γ wiedergefunden wurden.

Bei der Behandlung der Thiochrommethode ist in dem diesbezüglichen Kapitel unter § 6 auseinandergesetzt, dass es eigentlich falsch ist, wie wir dies hier getan haben, von der Annahme auszugehen, dass 1 γ Aneurin schlechthin einen Ausschlag von 5 mm ergibt. Wir müssen vielmehr aus der hinzugefügten Menge Aneurin und dem dazu gehörenden Ausschlag des Galvanometers berechnen, wie gross der Ausschlag für 1 γ Aneurin in Milch ist. Um über ein etwas umfangreicheres Ziffermaterial verfügen zu können, wurden die folgenden Versuche angestellt; wobei die folgenden Kombinationen von Milch, Wasser und Aneurin in den angegebenen Mengen Verwendung fanden:

1. 250 ccm Milch + 750 ccm Wasser;
2. 250 ccm Milch + 750 ccm Wasser + 20 γ Aneurin;
3. 250 ccm Milch + 750 ccm Wasser + 50 γ Aneurin;
4. 250 ccm Milch + 750 ccm Wasser + 100 γ Aneurin;
5. 250 ccm Milch + 750 ccm Wasser + 200 γ Aneurin.

Zu allen Mustern wurde 1 g Frankonit hinzugefügt. Nachdem dieses in der üblichen Weise behandelt worden war, wurden Portionen von 100 mg mit 0,3 und 0,5 ccm 1 %-igem Kaliumferricyanid oxydiert. Die höchsten Ausschläge beider Bestimmungen sind in der nachstehenden Tabelle angegeben (Bestimmungen a). Nach der Adsorption an Frankonit und der Entfernung desselben wurde nochmals 1 g Frankonit hinzugefügt. Auch hiervon wurden Portionen von 100 mg mit 0,3 und 0,5 ccm Blutlaugensalz oxydiert; (Bestimmungen b).

	Ausschlag in mm									
	1^a	1^b	2^a	2^b	3^a	3^b	4^a	4^b	5^a	5^b
Ausschlag für die Blankobestimmung..	3	1	3	2	6	2	8	2	8	3
Ausschlag für die oxydierte Bestimmung	26	4	35	6	50	7	70	10	113	16
Unterschied	23	3	32	4	44	5	62	8	105	13
Hinzugefügt für zu hohen Ausschlag der Blankobestimmung					3		5		5	
Insgesamt	26		36		52		75		123	
Korrigiert	23		33		46		69		111	
Ausschlag je γ Aneurin			5,0		4,6		4,6		4,4	

Wenn wir in derselben Weise die Daten des auf S. 35 beschriebenen Versuchs anordnen, dann wird aus einer Hinzufügung von 20 γ Aneurin ein Ausschlag von 10 mm für 2 γ gefunden, oder für 1 γ Aneurin ein solcher von 5,0 mm, während die auf Seite 18 beschriebenen Versuche für 5 γ Aneurin 4,9 mm, für 10 γ 4,6 mm und für 20 γ Aneurin einen Ausschlag von 4,5 mm je γ Aneurin ergeben.

Werden nun alle diese Ziffern kombiniert, dann wird für eine mit 100 mg aktivierten Frankonit vorgenommene Bestimmung Folgendes gefunden:

Bei Anwesenheit	von	2	γ	ein	Ausschlag	von	5,0	mm	je γ
„	„	„	5	γ	„	„	„	4,8	mm je γ
„	„	„	10	γ	„	„	„	4,6	mm je γ
„	„	„	20	γ	„	„	„	4,4	mm je γ

Wird der Versuch dagegen durch Oxydierung von 50 mg aktiviertem Frankonit ausgeführt, dann finden wir laut den Daten von S. 18 5,4 mm Ausschlag je γ Aneurin, dessen Wert bei grösseren Mengen bis 5,0 mm je γ sinkt.

Aus diesen Ziffern folgt, dass der Verlauf der Ausschläge des Galvanometers nicht ganz der Menge Aneurin proportional ist, sondern dass der Ausschlag je γ langsam sinkt, was mit den im ersten Teile dieser Dissertation festgestellten Tatsachen im Einklange steht.

Die folgenden Bestimmungen des Aneuringehaltes in Milch sind alle durch Oxydation von Portionen von 50 mg aktiviertem Frankonit ausgeführt, wofür ein Ausschlag von 5,4 mm je γ Aneurin gerechnet wurde, welcher Wert auf einem Ausschlag der Standard-Chininlösung von 75 mm basiert ist.

Ehe nun zu der zusammenfassenden Besprechung der Resultate der Untersuchung von Milch übergegangen wird, müssen noch zwei Massnahmen besprochen werden, nämlich die Wahl der Menge Blutlaugensalz bei der Oxydierung des Aneurins zu Thiochrom und die Verarbeitung des zu der Aneurinlösung hinzugefügten Frankonits.

Die Wahl der Menge Blutlaugensalz.

In seiner ursprünglichen Publikation vermeldete JANSEN, dass bei der Oxydierung von Aneurin zu Thiochrom ein Übermass Blutlaugensalz das gebildete Thiochrom weiter oxydiert und

dadurch zu niedrigen Resultate bewirkt. Diese Empfindlichkeit ist geringer, wenn die Oxydation in methylalkoholischem Milieu ausgeführt wird. Ausserdem hat sich mir gezeigt, dass die Empfindlichkeit für ein Übermass Blutlaugensalz von dem zu untersuchenden Produkt abhängt. Milchfrankonit ist z.B. viel weniger empfindlich als Roggenfrankonit. Zweifelsohne spielen hier die Beimischungen, die auch adsorbiert werden, eine Rolle. Schon früher sind wir der Möglichkeit einer induzierten Oxydation von Aneurin begegnet.

Die relative Beständigkeit gegen ein Übermass des Oxydationsmittels bietet den grossen Vorteil dar, dass für Routinearbeit die Methode bedeutend verkürzt werden kann. Nach der alten Vorschrift müssten von einem Milchfrankonit immer 4—5 Portionen mit verschiedenen Mengen Blutlaugensalz oxydiert werden, um den Höchstausschlag zu ermitteln.

Wenn man ein Milchfrankonit mit steigenden Mengen 1%-igem Kaliumferricyanid oxydiert, z.B. 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,7 und 1,0 ccm, dann zeigt sich, dass der Ausschlag des Galvanometers bezw. 12, 15, 15, 16, 15, 16, 13 mm sein könnte, das will sagen, dass der Höchstausschlag von 15—16 mm (dies liegt innerhalb der Genauigkeitsgrenzen der Methode) bei fast dem ganzen Trajekt — nämlich von 0,2 bis 0,7 cmm Blutlaugensalz — erreicht wird. Aus einer grossen Anzahl Versuche hat sich nun gezeigt, dass für Milch der Höchstausschlag fast immer bei Zusatz von 0,2 ccm Blutlaugensalz, immer aber bei Zusatz von 0,3 und von 0,5 ccm gefunden wird. Daher brauchen bei der Oxydierung von Milchfrankonit mithin nur zwei Portionen aktiviertes Frankonit abgewogen zu werden, die erste für die Blankobestimmung, die zweite für die Oxydation mit 0,4 ccm Blutlaugensalz. Dann wird immer der richtige Ausschlag gefunden.

Für Mehlfrankonit erwies sich 0,6 ccm Blutlaugensalz erforderlich, jedoch empfiehlt es sich, in diesem Falle immer zwei Portionen zu oxydieren, z.B. mit 0,5 und 0,7 ccm Blutlaugensalz, da die Empfindlichkeit für ein Übermass-Oxydationsmittel hier grösser ist als bei Milchfrankonit.

Das Entfernen des Frankonits aus der Flüssigkeit.

An zweiter Stelle muss ich darauf hinweisen, dass man die Flüssigkeit nicht — etwa wegen Zeitersparnis — von dem bereits mehr oder weniger zu Boden gesunkene Frankonit abgiessen darf, sondern dieselbe unerlässlich abzentrifugieren muss, da ja das

feinste Frankonit je Gewichtsseinheit die grösste Oberfläche hat und infolgedessen das meiste Aneurin adsorbieren, aber zugleich am langsamsten sinken wird. Bei Abgiessen geht immer ein Teil des Frankonits verloren, und gerade die feinsten Partikelchen werden am leichtesten vom Wasser mitgeschleppt werden. Es würde sich dann durch die heterogene Verteilung des Aneurins über das Frankonit ein unverhältnismässig grosser Verlust ergeben und hierdurch würden zu niedrige Resultate entstehen.

Die nachstehenden Ziffern geben an Hand des Galvanometerausschlages einen Eindruck von dem Zusammenhang zwischen Senkungszeit und der grösseren oder geringeren Feinheit der Frankonitteilchen.

Senkungszeit	Versuch 1	Versuch 2
10 Minuten	4 mm	9 mm
30 „	15 mm	17 mm
3 Stunden	21 mm	22 mm
5 „	23 mm	24 mm
Zentrifugieren	26 mm	25 mm

§ 3. Resultate der Aneurinbestimmung in Milch.

Vom 20. August bis zum 20. September 1937 wurden 135 Milchmuster auf ihren Aneuringehalt untersucht. Diese Muster waren alle bei verschiedenen Milchhändlern im Zentrum der Stadt Amsterdam gekauft. Das Resultat ist in Tabelle 1 angegeben.

Nachstehende graphische Darstellung gibt ein Bild von der Frequenz der gefundenen Aneuringehalte.

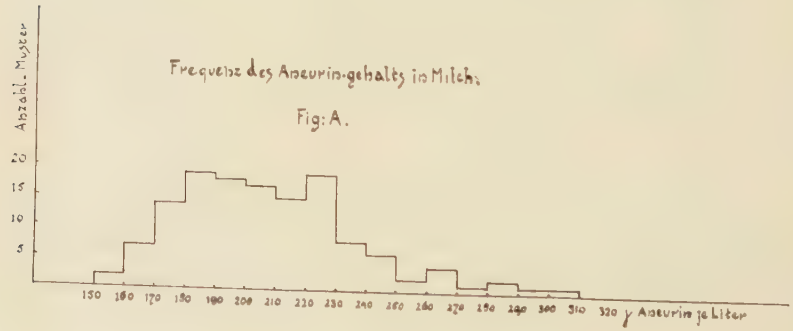


TABELLE 1.

Aneuringehalt von 135 Mustern Marktmilch 20/8—23/9 1937.

DATUM	< 160 γ je Liter	161—170 γ	171—180 γ	181—190 γ	191—200 γ	201—210 γ	211—220 γ	221—230 γ	231—240 γ	241—250 γ	> 250 γ	Durchschnitt
20/8		165	180 180	190		205 210						187
23/8	150		175	185	195 195		220	225				192
25/8		165	175	185 185 190	195	205	220	225		245		199
26/8		165			200 195	210 210	220					200
27/8	155	165		190	200						255	193
30/8			175 175	190 185	200 195	210		230	235		265	206
2/9			175	185 190				230			265	209
3/9						210	220 220	225 230	240			224
6/9				190		210 210					265	218
8/9							220 220 220	225		245		226
9/9					200		220 220		240	245	310	239
10/9		170	180	185		205	215		240		290	212
12/9			180 175		195			225 225			255	209
13/9				190 190 190	200		220	225 225		250		211
14/9		165	175		195 200			230	240		265	209
15/9			180	185	200	210 205	220	225				204
18/9				190	200 200	210		225 230		245	275	222
19/9			175	190 185		210	220 220		235 235 240		285	218
23/9		170	180		195 200	210 205 210		230 225 230 230		250		211
Anzahl	2	7	14	19	18	17	15	19	8	6	10	

Das Vorkommen zweier Gipfel in der Kurve könnte vielleicht auf einen verschiedenen Durchschnittsgehalt in Morgen- und Abendmilch zurückgeführt werden. Meine Daten genügen nicht, dies zu beweisen, aber sie deuten wohl auf die Möglichkeit hin. Ein Nachteil des von mir gegebenen Materials liegt in dem Umstande, dass die 135 Muster im Verlaufe eines Monates genommen sind, sodass eine Anzahl unbekannter Faktoren eine Rolle gespielt haben kann.

Diese 135 Muster wurden an 19 verschiedenen Tagen genommen, wobei jedesmal also etwa 7 Milchmuster untersucht wurden. Für diese 19 Tage habe ich den Tagesdurchschnitt berechnet und die Frequenzen der verschiedenen Tagesdurchschnitte verfolgt. Nachstehende Tabelle gibt das Resultat:

Tagesdurchschnitt	Frequenz
< 190 γ je Liter	1 ×
190 — 194 γ „	2 ×
195 — 199 γ „	1 ×
200 — 204 γ „	2 ×
205 — 209 γ „	4 ×
210 — 214 γ „	3 ×
215 — 219 γ „	2 ×
220 — 224 γ „	2 ×
225 — 230 γ „	1 ×
> 230 γ „	1 ×

Diese Tabelle lehrt uns, dass ein Tagesdurchschnitt von 205—209 γ Aneurin am häufigsten vorkam. Das Auffallende ist jedoch, dass dieser am meisten vorkommende Tagesdurchschnitt nicht mit einem der beiden Gipfel in der Kurve für den mittleren Aneuringehalt je Muster übereinstimmt, sondern gerade dazwischen liegt. Dies könnte eine Stütze für die Ansicht sein, dass Morgen- und Abendmilch einen verschiedenen Durchschnittswert haben. Für eine Bestätigung der von mir angegebenen Möglichkeit sind aber noch Versuche in ausgedehntem Umfange erforderlich.

Danach wurde verfolgt, ob die Pasteurisierungsmethode auf den Aneuringehalt der Milch von Einfluss ist. Die hierfür erforderlichen Milchmuster wurden mir wohlwollend von zwei hiesigen grossen Milchzentralen, O.V.V. und V.A.M.I. zur Verfügung gestellt. Die erstgenannte Genossenschaft pasteurisiert nach dem

Stassanoprinzip bei niedriger Temperatur, während der zweite Verein (V.A.M.I.) bei hoher Temperatur pasteurisiert. Dieser Unterschied in Methode kommt zum Ausdruck bei dem Verhalten der Milch in bezug auf die Storchsche Reaktion. Die Milch der O.V.V. ergibt eine positive, diejenige der V.A.M.I. eine negative Storch-Reaktion.

Bei der Untersuchung wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Datum	11. VIII	18. VIII	25. VIII
Rohmilch der V.A.M.I.....	210 γ je l	220 γ je l	190 γ je l
Pasteurisierte Milch der V.A.M.I.....	215 γ je l	215 γ je l	190 γ je l
Rohmilch der O.V.V.-Genossenschaft	200 γ je l	220 γ je l	230 γ je l
Pasteurisierte Milch der O.V.V.....	200 γ je l	220 γ je l	225 γ je l

Die konstatierten Unterschiede fallen alle innerhalb der Genauigkeitsgrenzen der Methode. Wir dürfen also wohl folgern, dass die jetzt meist üblichen angewandten Pasteurisierungsmethoden keinen Einfluss auf den Aneuringehalt der Milch haben.

Wie das Vitamin B_1 sich beim Kochen der Milch verhält, lehren folgende Ziffern:

Aneuringehalt der Rohmilch.....	255 γ je l
„ „ Milch nach 5 Minuten Kochen...	250 γ je l
„ „ „ „ 15 „ „ ...	225 γ je l
„ „ „ „ 30 „ „ ...	215 γ je l
„ „ „ „ 60 „ „ ...	170 γ je l

Bei Kochen für den Haushaltgebrauch sind also kaum Verluste an Vitamin B_1 zu erwarten.

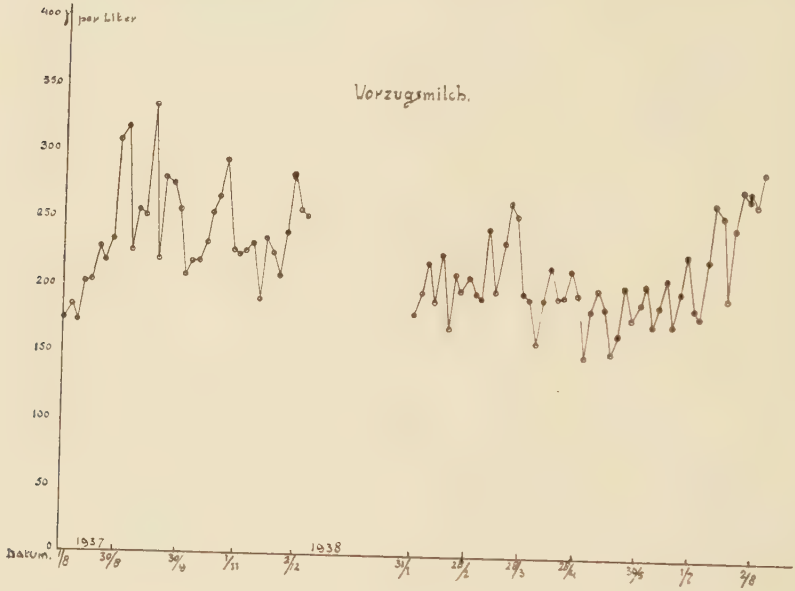
Um zu ermitteln, ob der Aneuringehalt der Milch durch die Jahreszeit beeinflusst wird, wurde während eines Jahres zweimal wöchentlich Milch auf ihren Aneuringehalt untersucht. Zu diesem Zwecke wurden drei Typen Milch gewählt:

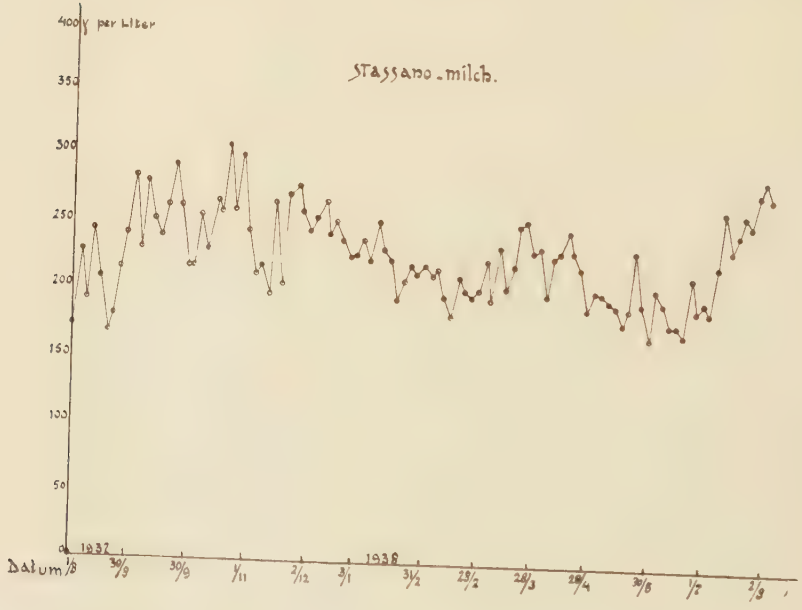
1. Milch, die von dem Muster-Betrieb Oud-Bussum zur Verfügung gestellt wurde.

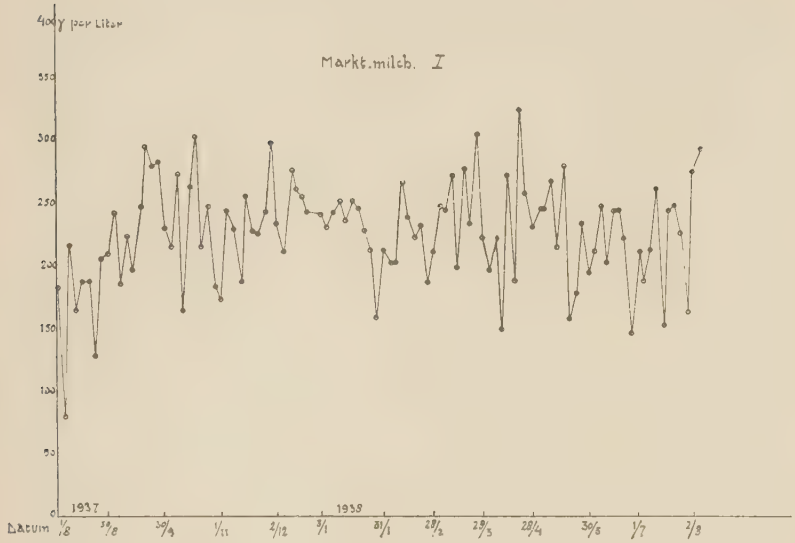
2. Fliessend pasteurisierte Milch, die immer bei demselben Milchhändler gekauft wurde und aus einem Amsterdamer Milchbetrieb herrührte.

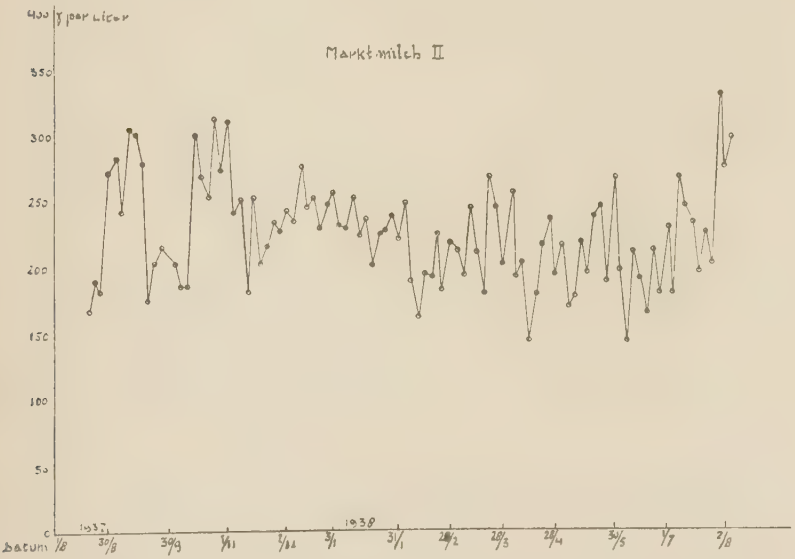
3. Marktmilch. Es wurde regelmässig bei zwei Milchhändlern in der Umgebung des Laboratoriums Milch gekauft.

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in den beigefügten graphischen Darstellungen zu finden.









Auch jetzt fällt es schwer, auf Grund des von mir zusammengebrachten Materials, zu definitiven Schlüssen zu kommen; aber Andeutungen in einer bestimmten Richtung sind doch wohl zu finden. Sie können allerdings erst durch ausgedehnte und zeitraubende Versuche endgültig bestätigt werden.

So zeigt die graphische Darstellung der von dem Musterbetriebe Oud-Bussum zugesandten Muster ein ziemlich deutliches Steigen des Aneuringehaltes im August und September 1937. Danach ist ein Sinken zu konstatieren. Im Dezember dieses genannten Jahres begann eine ernste Epidemie der Maul- und Klauenseuche, wodurch mir keine Milch zur Verfügung gestellt werden konnte. Am 1. Februar 1938 wurde die Untersuchung wieder aufgenommen und es zeigte sich, dass der Aneuringehalt noch weiter gesunken war. Diese sinkende Tendenz behauptete sich noch bis zum Ende des Monats, worauf im März eine Zunahme des Aneuringehaltes zu konstatieren war. Diese war jedoch nur von kurzer Dauer, und am 2. Mai erreichte der Aneuringehalt den tiefsten Punkt des Jahres. Danach war eine regelmässige Zunahme bis zum Ende der Untersuchung zu konstatieren.

Betrachten wir die graphische Darstellung der fliessend pasteurisierten Milch, dann ist dieselbe Tendenz, wenn auch geschwächt, erkennbar. Das Maximum fällt hier in den Anfang von September. In der Maul- und Klauenseucheperiode ist das regelmässige Sinken deutlich zu konstatieren, wenn es auch schwer ist, zu entscheiden, ob hier eine durch die Jahreszeit verursachte Abnahme vorliegt, oder ob dies durch die Krankheit verursacht ist. Der tiefste Punkt fällt in Mitte Februar, wonach auch hier wieder das kurze Zeit dauernde Steigen während März eintritt. Der niedrigste Punkt der darauf erfolgten Abnahme wird Ende Mai erreicht, wonach wieder eine starke, regelmässige Zunahme einsetzt, die bis zum Ende der Untersuchung anhält.

Eigentümlich ist es, dass die Zunahme des Aneuringehaltes erst im Sommer einsetzt. Der Übergang vom Stall nach der Weide könnte Ursache des Steigens im März sein. Die darauffolgende Abnahme könnte dann den Folgen der Kälberperiode zugeschrieben werden. Erst im Juli hatte der Aneuringehalt wieder seine normale Höhe erreicht, und von nun an dauerte die regelmässige Zunahme an.

Ganz anders ist das Bild, wenn wir die graphische Darstellung der Martkmilch betrachten. Die Milch des Milchhändlers 1 zeigt bei grossen Schwankungen ein Maximum des Aneuringehaltes in den Wintermonaten und niedrigere Ziffern in den Sommermonaten. Ob diese hohe Winterziffer durch das Füttern des Viehes mit Kartoffelschalen, Gemüseabfällen u. dergl. verursacht wird, also durch Material mit einem relativ hohen Gehalt an Vitamin B_1, ist möglich, aber keineswegs sicher. Es ist sogar möglich, dass die

Milch, welche der Milchhändler während des Untersuchungsjahres bekam, derart verschiedenen Ursprunges ist, dass es völlig unbegründet sein würde, Schlüsse zu ziehen. Es kann sich hier denn auch nur um Annahmen handeln.

Zum Schlusse gebe ich in Tabelle 2, (S. 48) die Resultate der Untersuchung von 50 Milchmustern an, die ebenfalls von dem Musterbetrieb „Oud-Bussum" zur Verfügung gestellt wurden und von 50 verschiedenen Kühen herstammten. Die Milch dieser Kühe habe ich mit einer Zwischenzeit von vier Tagen zweimal untersucht, wobei sich die völlig unerwartete Erscheinung ergab, dass die beiden Milchmuster jeder Kuh, bis auf eine vereinzelte Ausnahme, ungefähr denselben Aneuringehalt hatten. Diese Beobachtung ist jedenfalls sehr auffallend und soweit ich weiss, für keines der anderen Vitamine konstatiert.

Da auch für jede Kuh das von ihr gelieferte Milchquantum bekannt war, konnte ich die gesamte Aneurinmenge berechnen. Sie ist in der vierten Spalte angegeben.

In untenstehenden Tabellen habe ich die Häufigkeit (Frequenz) angegeben, mit welcher ein bestimmter Aneuringehalt vorkommt, und die Häufigkeit, mit welcher eine bestimmte totale Aneurinmenge angetroffen wird, um zu ermitteln, ob ein niedriger Aneuringehalt mehr oder weniger mit einem hohen Milchquantum zusammenfällt und umgekehrt, ob neben einem hohen Aneuringehalt ein niedriges Milchquantum einhergeht.

Wieder deuten die Ziffern an, dass diese Tendenz wahrscheinlich besteht, da die Streuung im Aneurinquantum geringer als im Aneuringehalt ist, aber der Unterschied ist nicht gross. Namentlich die hohen Aneuringehalte (über 350 γ je Liter) scheinen jedoch wohl zu einem niedrigen Milchquantum zu gehören. Sie kommen wenigstens mehr als hohe Aneurinquanten vor.

Grosse Vorsicht bleibt aber auch bei diesen Folgerungen geboten.

Häufigkeit des Aneuringehaltes.

< 100 γ	101—150 γ	151—200 γ	201—250 γ	251—300 γ	301—350 γ	351—400 γ	> 400 γ
0	6	15	8	8	3	5	2

Häufigkeit der Aneuringabe.

< 800 γ	800—1200 γ	1201—1600 γ	1601—2000 γ	2001—2400 γ	2401—2800 γ	2801—3200 γ	> 3200 γ
0	10	11	13	9	2	1	1

TABELLE 2.

Milchmuster; Aneuringehalt und Aneuringabe.

Nummer der Kuh	Aneuringehalt am 3. März 1938	Milchgabe	Aneuringabe	Aneuringehalt am 7. März 1938
40	187 γ	6 Liter	1120 γ	196 γ
94	166	7 1/2	1245	149
96	173	11 1/4	1900	169
104	168	6	1000	206
117	198	12 1/2	2370	198
122	137	10	1370	142
123	300	7	2100	258
125	211	11 1/2	2320	217
126	306	4 3/4	1530	346
135	102	9 1/4	950	108
148	180	14 1/4	2520	162
163	182	8 3/4	1620	182
171	130	12 1/4	1560	133
175	192	8 1/2	1630	186
187	224	5	1120	273
193	288	4	1152	301
194	180	9	1620	174
197	108	13 1/2	1460	108
200	224	12 1/2	2760	245
201	219	7 1/2	1640	225
202	420	5 1/2	2310	414
203	246	8 1/2	2090	246
206	270	5 3/4	1550	312
207	107	12 1/2	1340	101
210	153	5 3/4	890	195
211	189	9 1/2	1795	195
216	364	5	1820	336
221	364	5 1/4	1910	379
222	327	8 1/2	3080	315
225	297	5	1490	225
229	365	4 1/2	1620	425
230	360	3 1/4	1170	371
231	360	5 3/4	2070	—
232	300	4	1200	282
241	338	6	2020	—
243	160	6	960	168
244	137	9 1/4	1270	145
245	252	6	1510	246
260	213	6 1/4	1760	213
261	479	5	2395	431
262	280	11 1/2	3220	274
263	280	6	1680	293
265	250	8 3/4	2180	278
267	225	4 3/4	1070	237
268	171	9 1/2	1620	184
269	202	7 1/4	1465	211
255	160	11	1760	184

§ 4. Aneurinbestimmung in Milchpulver.

Das im Handel gangbare Milchpulver ist, je nach seiner Bereitungsweise, entweder ganz oder nicht ganz in Wasser löslich. Für die Untersuchung des völlig löslichen Produktes kann natürlich dieselbe Methode wie für die Aneurinbestimmung in Milch angewandt werden.

Das mir zur Verfügung stehende Milchpulver besass diese Eigenschaft jedoch nicht, sodass dabei etwas anders verfahren werden musste. Ich folgte zwei Wegen, welche, wie sich zeigte, beide zu dem erstrebten Ziele führten.

Anfangs wählte ich die Methode, die auf dem Lösen des Kaseins in verdünntem Ammoniak beruhte. (Wenn Vollmilchpulver untersucht werden muss, empfiehlt es sich, dieses erst mit Äther zu entfetten).

16 g Magermilchpulver wurden in 800 ccm Wasser gebracht und unter fortgesetztem Rühren wurden 25 ccm 10 %-iges Ammoniak hinzugefügt. Die Ammoniakkonzentration ist dann 0,3 %, und das Kasein löst sich dabei auf. Danach wurde die Flüssigkeit mit 10 %-iger Salzsäure sehr schwach angesäuert. Da dieses Ansäuern genau erfolgen muss, weil bei zuviel Säure das Kasein wieder niederschlägt, habe ich später so verfahren, dass nach Zusatz von 25 ccm 10 % Ammoniak mit 25 ccm Salzsäure einer Konzentration neutralisiert wurde, die etwas niedriger als diejenige des Ammoniaks war (z. B. 9,75 %). Das anfängliche Hinzusetzen eines grossen Übermasses Ammoniak ist erforderlich, weil das Kasein sonst sich nicht schnell genug löst.

Der erhaltenen Flüssigkeit wird dann 1 g Frankonit zugesetzt. Nachdem dieses abzentrifugiert ist, wird die Adsorption wiederholt, weil bei diesem p_H nicht alles Aneurin adsorbiert wird. Auf die bereits an anderer Stelle ausführlich besprochene Weise werden Portionen von 100 mg mit 0,2 und 0,4 ccm 1 %-igem Rotblutlaugensalz oxydiert.

Nachdem durch Zusatz einer bekannten Menge Aneurin zu der Flüssigkeit der Ausschlag je γ Aneurin bestimmt ist, kann der Aneuringehalt des Milchpulvers berechnet werden. Die Versuchsanordnung und die Resultate der Bestimmung waren folgendermassen:

Ausgegangen wurde von dreimal 16 g Magermilchpulver. Der zweiten und dritten Portion wurden 50, bezw. 100 γ Aneurin zugefügt. Die Adsorption wurde zweimal hintereinander an 1 g

Frankonit ausgeführt. Oxydiert wurden 100 mg aktiviertes Frankonit.

Die Ausschläge des Galvanometers für die Portion ohne Aneurinzusatz betrugen 12 und 1 mm, also insgesamt 13 mm. Für die Portion, welcher 50 γ Aneurin zugesetzt waren, betrugen sie 33 − 4 = 37 mm und für diejenige, der 100 γ hinzugefügt waren: 53 + 6 = 59 mm.

Ich fand also 37 — 13 = 24 mm für 5 γ und 59 — 13 = 46 mm für 10 γ. Bei der Berechnung ist der höchste Ausschlag, derjenige von 4,8 mm, je γ gewählt.

Der Ausschlag von 13 mm entspricht also einem Wert von 170 γ Aneurin je 100 g Magermilchpulver. Rechnen wir nun einen Trockenrest in Magermilch von 8,5 %, dann entspricht dieser Aneuringehalt einem Quantum von 200 γ Aneurin je Liter Milch.

Darauf wurde versucht, das Milchpulver zu extrahieren, also ohne dass das Eiweiss dabei zur Lösung gebracht wurde.

50 g Milchpulver wurden eine ½ Stunde mit 1 Liter Wasser extrahiert (Flüssigkeit I). Nach Abzentrifugieren wurde der Rückstand noch einmal in derselben Weise extrahiert (Flüssigkeit II). In analoger Weise wurde eine dritte und vierte Flüssigkeit (III und IV) erhalten.

Allen Extrakten wurde 1 g Frankonit zugesetzt, während Flüssigkeit I zweimal mit Frankonit behandelt wurde, weil andernfalls nicht alles Aneurin adsorbiert werden würde. Die Ausschläge des Galvanometers waren bezw. für Flüssigkeit I 31 mm und 4 mm, für Flüssigkeit II 4 mm; die Flüssigkeiten III und IV zeigten nach Oxydation keine Thiochrom-Fluoreszenz. Das Milchpulver muss also zweimal extrahiert werden, wenn die Extraktion vollständig sein soll.

Der Gesamtausschlag betrug 39 mm, (ausgehend von 50 g), welches Resultat mit den nach der Lösungsmethode erhaltenen Ziffern, nämlich 13 mm für 16 g, übereinstimmt.

Kapitel III.

ANEURINBESTIMMUNG IN GETREIDEARTEN UND KARTOFFELN

§ 1. *Einleitung.*

Vor der Beschreibung der Versuche, die zwecks Bestimmung des Aneuringehaltes in einigen Getreidearten angestellt wurden, sei erst kurz Einiges über den Bau des Getreidekorns und den Zweck des Mahlprozesses mitgeteilt, durch den das Getreidekorn längs dem Wege mehrerer Zwischenprodukte schliesslich zu dem feinsten Mehltypus verarbeitet wird.

An dem Getreidekorn sind deutlich drei Teile zu unterscheiden. An der Aussenseite befinden sich zunächst eine Anzahl Deckschichten, welche die eigentliche Hülle bilden. Im Innern findet sich der Keim oder Embryo und ferner das dritte Element, die Stärkezellen oder das Endosperm, die wohl den grössten Teil des Getreidekorns ausmachen.

Die Hülle besteht ihrerseits wieder aus einer grossen Anzahl Schichten. Die äusserste derselben, eine Schicht, in welcher schon Verholzung eintritt, ist die Schale. Darunter liegt das Perisperm, (beim Reis bekannt als das Silberhäutchen) in Form einer Membran, die die darunterliegende Aleuronschicht abschliesst. Diese letztere ist eine Reihe grosser Zellen, die den Übergang zum Endosperm bilden, das seinerseits als Nahrung für den sich entwickelnden Keim bestimmt ist.

Der Mahlprozess bezweckt, den Keim und alle holzartigen Teile des Korns zu entfernen.

Beim Mahlprozess kennt man zwei Methoden: die Flachmüllerei und die Hochmüllerei. Die Flachmüllerei ist das älteste Verfahren; bei ihr wird das Getreidekorn, das durch eine Vorreinigung von

Verunreinigungen, der Schale und dem Keim befreit ist, zwischen Mühlsteinen oder Walzen gemahlen. Diese Walzen sind derart eng gestellt, dass das Korn beim Passieren derselben in einem Male völlig feingemahlen wird. Das auf diese Weise erhaltene, sogenannte ungebeutelte, Mehl enthält also fast alle Bestandteile des ursprünglichen Kornes. Bei der Hochmüllerei verfährt man anders. Infolge des Umstandes, dass die Walzen beim ersten Passieren der Getreidekörner noch einen grösseren Zwischenraum zwischen sich lassen, wird das Korn nicht feingemahlen, sondern in einzelne, noch relativ grosse Stückchen zerkleinert, wobei jedoch ein Teil des feinsten Mehles aus den Reststückchen loslässt und durch ein Sieb von den gröberen Stücken (Schrot) getrennt wird. In dem nächsten, enger gestellten Walzenpaar werden die gröberen Stücke zu feineren gemahlen, wobei wieder feines Mehl und kleinere Stücke (gröbere Griesse) entstehen. Dieser Prozess wiederholt sich zwischen einer Anzahl immer enger gestellten Walzenpaaren, wobei das Mehl immer reicher an besonders aus der Aleuronschicht herrührenden Nebenprodukten, und der zurückgebliebene Teil immer ärmer an Stärke wird, wobei schliesslich die Kleie zurückbleibt. So entsteht eine ganze Reihe von Mehlprodukten, die im Handel mit sehr abweichenden Namen belegt werden, besonders auch das allerfeinste Mehl, das in Holland Patentmehl genannt wird; danach folgt oo-Mehl, o-Mehl, Mehl 1, 2, 3 usw. (Nachmehle), Dunst, Griess, Schrot und Kleie.

Dieser Mahlprozess ist von grosser Bedeutung für den Aneuringehalt des Produktes. Das Vitamin B_1 ist nämlich in den äussersten Schichten (und zwar im besonderen in der Aleuronschicht) und dem Keim angehäuft. Da dieser letztere aber immer entfernt wird, weil er beim Aufbewahren das Mehl verderben würde, u.a. durch Ranzigwerden des in dem Kern eingeschlossenen Fettes, ist die Menge des im Mehl vorhandenen Aleurons, global genommen, ein Mass für den Vitamingehalt des Mehles. Je weiter das Mehl ausgemahlen ist, desto weniger Aneurin wird es enthalten. Ungebeuteltes Mehl wird also viel, Kernmehl (Patentmehl) dagegen kein oder fast kein Aneurin enthalten.

Um diese Ansicht an den Resultaten zu prüfen, welche die Thiochrommethode uns verschafft, wurde denn auch eine Anzahl Mühlenprodukte auf ihren Aneuringehalt untersucht.

Nunmehr werde ich zu der Besprechung der Resultate übergehen, die bei der Untersuchung einiger Getreidearten und ihrer Vermahlungsprodukte erhalten wurden.

§ 2. *Weizen.*

Zunächst wollte ich den Aneuringehalt von ungebeuteltem Weizenmehl bestimmen. Zu diesem Zweck wurden 50 g Mehl durch stetiges Umrühren mit 300 ccm Wasser, das mit verdünnter Schwefelsäure auf ein $p_H = 3$ gebracht war, bei Zimmertemperatur extrahiert. Nach zwei Stunden wurde die Extraktionsflüssigkeit abzentrifugiert und der Rückstand aufs neue, jetzt während einer Stunde, extrahiert. Danach wurde dieser Extraktionsprozess noch einmal wiederholt, und hierauf wurden die drei Portionen Extraktionsflüssigkeit zusammengegossen.

Um zu ermitteln, ob durch die drei ersten Extraktionen alles Aneurin aus dem Mehl entfernt war, wurde der Rückstand zum vierten Male mit 300 ccm Wasser eine Stunde lang extrahiert.

Beide Extrakte, derjenige der drei ersten Mengen und der vierte, wurden filtriert, und danach wurde jedem 1 g Frankonit hinzugefügt. Danach wurde das letztere in der auf Seite 8 u. f. beschriebenen Weise abzentrifugiert, ausgewaschen und danach getrocknet. Darauf wurden Portionen von je 100 mg in der ebenfalls schon beschriebenen Weise mit bezw. 0,4, 0,6 und 0,8 ccm 1 %-igem rotem Blutlaugensalz oxydiert. Der Ausschlag für die Blankobestimmung betrug 7 mm; diejenigen für die oxydierten Portionen waren bezw. 69, 71 und 71 mm höher.

Von dem zweiten Extrakt, also dem vierten Auswaschwasser, ergaben 100 mg aktiviertes Frankonit einen Ausschlag, der 4 mm grösser war als die entsprechende Blankobestimmung, sodass der gesamte Aneuringehalt der 50 g Weizenmehl also auf Grund eines Ausschlages des Galvanometers von 71 + 4 = 75 mm berechnet werden muss. Ein fünfter Extrakt enthielt kein Aneurin mehr.

Um zu kontrollieren, ob auf diese Weise alles Aneurin in Form vom Thiochrom gemessen worden war, wurde der oben beschriebene Versuch wiederholt, doch nun wurde dem Extrakt eine bekannte Menge Aneurin hinzugefügt, worauf eine neue Bestimmung, diesmal in etwas geänderter Weise ausgeführt wurde.

12½ g Weizenmehl wurden dreimal mit 300 ccm Wasser von einem $p_H = 3$ bei 50° extrahiert. Es stellte sich nämlich heraus, dass bei dieser Temperatur bereits eine dreimalige Extraktion zum vollständigen Ausziehen genügte. Die drei Extraktionsflüssigkeiten wurden vereinigt und filtriert, und danach wurde 1 g Frankonit hinzugesetzt. Dann wurden nach der üblichen

Bearbeitungsweise Portionen von je 100 mg von diesem aktivierten Frankonit mit bezw. 0,4, 0,6 und 0,8 ccm rotem Blutlaugensalz oxydiert, wobei die Ausschläge bezw. 17, 18 und 18 mm höher waren als diejenigen der Blankobestimmung.

Dem auf analoge Weise erhaltenen Extrakt einer neuen Portion von 12½ g wurden 50 γ Aneurin zugesetzt. Danach wurde an 1 g Frankonit adsorbiert, und dieses wurde in der im vorigen Abschnitt beschriebenen Weise weiter verarbeitet. Der Ausschlag des Galvanometers betrug dann 35 mm mehr als für die Blankobestimmung, die einen Ausschlag von 8 mm ergeben hatte.

Der Unterschied zwischen der Bestimmung ohne extra Aneurinhinzufügung und mit einer solchen betrug also nur 35—18 = 17 mm, und zwar für 50 : 10 = 5 γ Aneurin. Dies bedeutete nach der alten Auffassung, d.h. derjenigen, nach welcher 1 γ Aneurin einen Ausschlag von 5 mm ergibt, ein Defizit von 8 mm.

Anfänglich wurden für das Entstehen dieses Defizits zwei Möglichkeiten angenommen, nämlich:

1. Bei der Extraktion ist nicht alles Aneurin in der Flüssigkeit gelöst, durch den Umstand, dass die Stärke einen Teil desselben adsorbiert.

2. Bei der Adsorption an das Frankonit ist nicht alles Aneurin adsorbiert.

Zwecks Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten wurde folgendermassen verfahren:

ad 1. Das schon extrahierte Mehl wurde nochmals extrahiert. Der Extrakt wurde mit Frankonit behandelt; doch die Oxydierung desselben ergab kein Thiochrom mehr. Um aber ganz sicher zu sein, wurde auch noch ein Tierversuch angestellt, der in der auf S. 4 beschriebenen Weise ausgeführt wurde. Es zeigte sich, dass die betreffenden Ratten (4 Tiere) auf die Verabfolgung des extrahierten Mehles durchaus nicht reagierten, sodass man also wohl annehmen darf, dass tatsächlich alles Aneurin aus dem Mehl entfernt ist. Die erste Hypothese muss somit verworfen werden.

ad. 2. Das schon einmal mit Frankonit behandelte Filtrat wurde abermals dieser Behandlung unterworfen. Bei Oxydierung von 100 mg dieser zweiten Portion Frankonit wurde kein Thiochrom mehr gebildet. Auch diese zweite Hypothese musste also verworfen werden.

In der Befürchtung, dass bei der ursprünglichen Bestimmung vielleicht ein Fehler gemacht sein könne, wurde die Oxydierung

desselben Frankonits wiederholt. Wegen Mangels an Material wurden Portionen von nur 50 g aktivierten Frankonits oxydiert, jedoch ebenfalls mit bezw. 0,4, 0,6 und 0,8 ccm rotem Blutlaugensalz. Die Ausschläge des Galvanometers waren jetzt 12 und 22 mm. Dies bedeutet also einen Ausschlag von 22—12 = 10 mm, für 50 : 20 = $2\frac{1}{2}$ γ Aneurin statt der bei der Oxydierung von 100 mg erhaltenen 17 mm für 5 γ Aneurin.

Auf Seite 15 u. f. ist ausführlich dargelegt, wie diese Ziffern die Grundlage gebildet haben für das Erhalten eines besseren Einblicks in die Umstände, unter welchen diese Bestimmung verläuft. Der Schluss, zu welchem ich auf S. 24 gekommen bin, ist, dass das Frankonit einen Teil des gebildeten Thiochroms adsorbiert hält, sodass es notwendig ist, immer dieselbe Menge aktiviertes Frankonit zu oxydieren, wenn man vergleichbare Ziffern erhalten will. Die hierfür geeignetste Menge ist 50 mg.

Diese Momente ergaben aber immer noch keine Lösung der Tatsache, dass für $2\frac{1}{2}$ γ hinzugefügtes Aneurin nur ein Ausschlag von 10 mm gefunden wurde, statt 13 mm, wie berechnet war. Diese Ausschläge waren aber zu klein, um das Ziehen von Schlüssen zu rechtfertigen, und ich entschloss mich, den Versuch mit grösseren Mengen Material zu wiederholen.

Zu diesem Zweck wurden 2 × 10 g ungebeuteltes Weizenmehl in der beschriebenen Weise extrahiert. Dem ersten Extrakt wurde $\frac{1}{2}$ g Frankonit zugesetzt. Zum zweiten wurden erst 50 γ Aneurin hinzugefügt und danach $\frac{1}{2}$ g Frankonit. Von beiden Mustern aktivierten Frankonits wurden Portionen von je 50 mg mit 0,4, 0,6 und 0,8 ccm rotem Blutlaugensalz oxydiert.

Der Ausschlag für die Extraktflüssigkeiten 1 bis 3 (einschliesslich), denen kein extra Aneurin zugefügt war, betrug 18 mm mehr als derjenige für die Blankobestimmung. Für diejenigen Flüssigkeiten, bei welchen dagegen extra Aneurin hinzugefügt war, betrug der Ausschlag 39 mm mehr. In beiden Fällen enthielt weder der vierte Extrakt, noch zum zweiten Male dem Extrakt zugesetztes Frankonit messbare Mengen Aneurin.

Ich fand zwischen beiden Bestimmungen einen Unterschied von 21 mm, und zwar für 50 : 10 = 5 γ Aneurin, also einen Fehlwert von etwa 6—7 mm.

Zu 1 Liter Weizenextrakt wurden 500 mg Frankonit hinzugefügt. Hiervon wurden Portionen von 50 mg oxydiert. Der

Ausschlag des Galvanometers war 49 mm höher als für die Blankobestimmung.

Zu einer zweiten Portion von 1 Liter Extrakt wurden 20 γ Aneurin hinzugefügt. Nachdem diese Portion in der oben beschriebenen Weise behandelt worden war, ergab sie einen Ausschlag, der denjenigen der Blankobestimmung um 57 mm übertraf. Bei Hinzufügung von 50 und 100 γ Aneurin fand ich in entsprechender Weise bezw. 70 und 87 mm.

Hieraus folgt:

2 γ	Aneurin	ergeben	einen	Ausschlag	von	8 mm;	1 γ	Aneurin also	4,0 mm
5 γ	„	„	„	„	„	21 mm;	1 γ	„ „	4,2 mm
10 γ	„	„	„	„	„	38 mm;	1 γ	„ „	3,8 mm

Obgleich die erste dieser drei Bestimmungen wegen des geringen Ausschlages nicht genau sein dürfte, folgt aus diesen Daten doch wohl ein mittlerer Ausschlag von 4,0 mm je γ Aneurin. (Alle diese Bestimmungen sind auf einem Ausschlag der Standard-Chininlösung von 75 mm basiert).

Auf Grund der Darlegungen auf S. 25 u. f. sind wir somit berechtigt, zu sagen, dass nach diesen Versuchen in diesem Weizenextrakt 1 γ Aneurin einen Ausschlag von 4,0 mm ergibt..

Der vorige Versuch ergab einen Ausschlag von 21 mm für 5 γ Aneurin, also einen Ausschlag von 4,2 mm je γ.

Noch eine andere Bestimmung hatte einen Wert von 4,0 mm je γ Aneurin ergeben. Alle diese Daten begründen somit die Annahme, dass unter den festgestellten Verhältnissen 1 γ Aneurin in Weizenextrakt einen Ausschlag von 4,1 mm ergibt.

Mit diesem Befunde wurde nunmehr die Untersuchung verschiedener Weizensorten begonnen. Durch wohlwollendes Entgegenkommen der Direktion der „Stoommeelfabriek Holland" wurde mir eine grosse Anzahl Muster verschiedener Weizensorten zur Verfügung gestellt. Das Aussehen der Weizenkörner ist, je nach der Art, sehr verschieden. Einige sind klein und dunkel, andere dagegen grösser oder heller. Je kleiner die Körner sind, einen um so grösseren Prozentsatz des Ganzen machen die verschiedenen Samenhüllen aus, und da, wie in der Einleitung dieses Kapitels erwähnt wurde, das Vitamin B_1 namentlich in der Umgebung der Samenhäutchen angehäuft ist, lässt sich erwarten, dass ein solches Korn einen höheren Gehalt an Vitamin haben wird als die grösseren Typen.

Ein anderes Moment, das nähere Beachtung verdient, ist das-

jenige der Farbe. Wie schon ausführlich dargelegt wurde, kann die Anwesenheit bestimmter Stoffe im Extrakt des zu untersuchenden Materials, die mit an das Frankonit adsorbiert werden, die Ursache sein, dass für 1 γ Aneurin ein niedrigerer Ausschlag auf dem Galvanometer abgelesen wird als ohne die Anwesenheit dieser Stoffe. Es lag nun die Annahme nahe, dass diese Störung auch bei der Untersuchung verschiedener Weizensorten eintreten könnte, wenn z.B. das eine Mal der Aneuringehalt einer helleren, das andere Mal derjenige einer dunkleren Sorte bestimmt wurde. Ein Extraks der letztgenannten Art war in der Tat viel dunkler gefärbt als derjenige von hellgefärbten Körnern, und die Erwartung, dass die Störung bei dem dunkleren Extrakt grösser sein werde als bei einem nur schwachgefärbten Extrakt, erwies sich als durchaus begründet. Während ich für die hellen Sorten einen Ausschlag von 4,3 oder 4,2 mm je γ Aneurin fand, konnte derselbe bei dunkleren Sorten auf 3,8 und 3,7 mm sinken. Es genügt also nicht, den Ausschlag je 1 γ Aneurin in Weizen schlechthin zu bestimmen, sondern man muss den Ausschlag je γ Aneurin eigentlich in jedem bestimmten Weizenmuster gesondert bestimmen. Nur dann kann man zu einer richtigen Berechnung des Aneuringehaltes kommen.

Ehe ich nunmehr zur Besprechung der Untersuchung der verschiedenen Weizensorten übergehe, muss ich noch Einiges über die Interpretierung des Ausschlages des Galvanometers für die Blankobestimmung mitteilen.

Bei der Aneurinbestimmung in Milch betrug der Ausschlag für die Blankobestimmung, wie schon in dem betreffenden Kapitel beschrieben wurde, nie mehr als 2—3 mm. Die Farbe des Fluoreszenzlichtes war gelbgrün und unterschied sich deutlich von der blauen Farbe des Thiochromlichtes. Anders wurde die Sachlage aber, als extra Aneurin in nicht zu geringen Mengen hinzugefügt wurde. Die Farbe des Fluoreszenzlichtes der Blankobestimmung wurde nun blauer, und zwar umsomehr, je mehr Aneurin zugesetzt worden war. Parallel hiermit stieg auch der Galvanometerausschlag auf 4, 5 oder 6 mm. Auf Grund der auf S. 36 schon dargelegten Tatsachen meinte ich, wenn ein derart hoher Ausschlag für die Blankobestimmung bei Milch gefunden wurde, den über 3 mm hinausgehenden Ausschlag auf Rechnung des noch aus dem Aneurin gebildeten Thiochroms setzen zu dürfen.

Dieselbe Erscheinung, jedoch in verstärktem Masse, ergibt sich nun bei der Bestimmung von Aneurin in Mehlsorten. Der Aus-

schlag für eine Blankobestimmung ist mindestens 5—6 mm und kann, wenn der Aneuringehalt durch Extrazusatz erhöht ist, auf 10—12 mm steigen. Bereits im ersten Falle ist die Farbe des Fluoreszenzlichtes merkbar blau; die Intensität dieser Farbe nimmt in demselben Masse zu, wie der Ausschlag der Blankobestimmung höher wird, welche Erscheinung, global genommen, wieder der vorhandenen Menge Aneurin parallel läuft. Während bei Milch der wirkliche Wert der Vorfluoreszenz verhältnismässig einfach dadurch gefunden werden konnte, dass die Butanolschicht mit einem Tropfen 38 %-iger Salzsäure angesäuert wurde, wobei die blaue Fluoreszenz verschwand und nur der ursprüngliche Ausschlag der Blankobestimmung übrigblieb, war dieses Verfahren bei Mehlarten nicht anwendbar, weil die Isobutanolschicht in diesem Falle trübe wurde, wodurch sich eine zu geringe Intensität des Fluoreszenzlichtes ergab.

Es war mithin nicht möglich, auf diese Weise exakt den eigentlichen Wert des Ausschlages für die Blankobestimmung zu messen.

Daher wurde versucht, der Oxydation von Aneurin beim Vornehmen der Blankobestimmung durch Hinzufügung des stark oxydablen Vitamins C vorzubeugen. Der Versuch wurde folgendermassen ausgeführt:

Ausgegangen wurde von zweimal 1 Liter Weizenextrakt. Der zweiten Portion wurden 100 γ Aneurin hinzugefügt und danach beiden Portionen 500 mg Frankonit. Von beiden Frankonitmustern wurden in der üblichen Weise Portionen von je 50 mg mit bezw. 0,6 und 0,8 ccm rotem Blutlaugensalz oxydiert.

Danach wurden zu 50 mg aktiviertem Frankonit 25 mg Askorbinsäure hinzugefügt und wurde das Frankonit in derselben Weise wie bei jeder anderen Blankobestimmung bearbeitet und gemessen. Dasselbe geschah aufs neue nach Hinzufügung von 50 mg und 75 mg Askorbinsäure. Ich erhielt dabei die folgenden Resultate:

	ohne Aneurinhinzufügung				mit Aneurinhinzufügung			
	ohne Vit. C	25 mg Vit. C	50 mg Vit. C	75 mg Vit. C	ohne Vit. C	25 mg Vit. C	50 mg Vit. C	75 mg V
blanko	7 mm	6 mm	4 mm	4 mm	9 mm	7 mm	4 mm	4 m
oxydiert	27 mm			–	60 mm	—	—	—

Hieraus könnte folgen, dass der Ausschlag für die Blankobestimmung etwa 4 mm sein müsste, wenn wir nicht die Möglichkeit berücksichtigen müssten, dass die die Vorfluoreszenz verursachenden Stoffe auch durch die Askorbinsäure reduziert sein könnten.

Wenn wir nun aber konstatieren können, dass die Farbe des Fluoreszenzlichtes bei dem Versuch, bei welchem 50 mg Askorbinsäure gebraucht war, gelbgrün und nicht mehr blau war, dann sind wir nicht weit von der Wahrheit entfernt, wenn wir von dem abgelesenen Ausschlag einer in normaler Weise behandelten Blankobestimmung von z.B. 7—8 mm ungefähr 4—5 mm auf Rechnung der normalen Vorfluoreszenz setzen und den Rest als durch Thiochrom verursacht betrachten.

Diese Annahme ist natürlich nicht ganz exakt; doch bei einem Gesamtausschlag von 20, 30 oder 40 mm fällt der mögliche Fehler ziemlich innerhalb der Genauigkeit des Versuches.

Bei den weiteren Untersuchungen wurden die Bestimmungen mit Hinzufügungen mit Askorbinsäure jedoch nicht immer mehr ausgeführt, da das kein Nutzen hatte.

Die obigen Erwägungen führten zum Aufstellen eines allgemeinen Schemas für das Bestimmen des Aneuringehaltes eines bestimmten Produktes. Durch Hinzufügung zweier verschiedener Mengen Aneurin zu Portionen des Extraktes des zu untersuchenden Produktes wurden zwei Werte für den Ausschlag von 1 γ Aneurin erhalten, sodass, wenn diese Bestimmungen übereinstimmten — und eine solche Übereinstimmung konnte ich bei meinen Versuchen stets konstatieren — ein zuverlässiger mittlerer Ausschlag gefunden werden konnte.

Der Versuch wurde also eigentlich in triplo ausgeführt, nämlich erstens durch die Bestimmung im Extrakte selbst, die uns den Aneuringehalt des zu untersuchenden Materials kennen lehren musste, wonach die beiden Bestimmungen im Extrakt, dem extra Aneurin hinzugefügt wurde, folgten und aus welchen der Ausschlag je γ Aneurin berechnet wurde. Diese dreifache Bestimmung brachte jedoch mit sich, dass einerseits ziemlich viel Material benötigt wurde und anderseits auch Zeit damit verloren ging. Der Nachteil des grösseren Materialbedarfs wurde nun dadurch behoben, dass statt 1 g Frankonit nur 250 mg zugesetzt wurden, welche Menge zum Ausführen von 4 Bestimmungen mit je 50 mg ausreichte; (eine geringe Menge Frankonit geht immer wohl ver-

loren). Auf diese Weise wurde der Materialverbrauch auf ein Viertel des ursprünglichen reduziert.

Die Versuche, mittels deren die verschiedenen Weizensorten auf ihren Aneuringehalt untersucht wurden, wurden nach dem hier unten wiedergegebenen Schema ausgeführt.

Von den gemahlenen Weizenkörnern wurden 25 g dreimal mit 500 ccm Wasser von einem $p_H = 3$ bei 50° bezw. während drei, zwei und einer Stunde extrahiert. Der filtrierte Extrakt wurde in drei gleiche Teile geteilt. Zu der zweiten und dritten Portion wurden bezw. 20 und 50 γ Aneurin hinzugefügt, wonach das Aneurin an 250 mg Frankonit adsorbiert wurde. Dann wurde dieses Frankonit in der üblichen Weise abgeschieden, gewaschen und getrocknet und hierauf wurden Portionen von je 50 mg mit bezw. 0,4 und 0,7 ccm 1 %-igem rotem Blutlaugensalz oxydiert.

Die Resultate sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst.

Weizensorte	Korrigierter Ausschlag	Ausschlag je γ Vitamin B_1	Gehalt je g
Manitoba	36 mm	3,8 mm, berechnet aus 20 γ 3,6 mm, „ „ 50 γ	5,5 γ
Rumänischer	31 mm	4,0 mm, berechnet aus 20 γ 3,7 mm, „ „ 50 γ	4,8 γ
Kalifornischer	21 mm	4,0 mm, berechnet aus 20 γ 3,7 mm, „ „ 50 γ	3,2 γ
Inländischer Roter A	27 mm	3,8 mm, berechnet aus 20 γ 3,8 mm, „ „ 50 γ	4,3 γ
„ „ A (ein zweites Muster)	26 mm	3,8 mm, berechnet aus 20 γ 3,7 mm, „ „ 50 γ	4,1 γ
Inländischer Weisser (Siegeländer)	24 mm	4,0 mm, berechnet aus 20 γ 3,8 mm, „ „ 50 γ	3,6 γ
Australischer	26 mm	3,7 mm, berechnet aus 20 γ 3,7 mm, „ „ 50 γ	4,2 γ
La Plata	30 mm	4,3 mm, berechnet aus 20 γ 4,1 mm, „ „ 50 γ	4,2 γ

Über die Bedeutung der auch hier konstatierbaren sinkenden Tendenz für den Ausschlag je γ Aneurin nach Massgabe der vorhandenen Menge ist bereits bei der Milchuntersuchung ge-

sprochen. Es möge genügen, zu bemerken, dass hier für die Berechnung immer der aus 20 γ berechnete Ausschlag gewählt wurde.

Wir ersehen aus den hier gegebenen Ziffern, dass der Aneuringehalt der verschiedenen Weizensorten nicht unerheblich voneinander abweichen kann. Als niedrigsten Wert fand ich 3,2 γ Aneurin je g bei dem kalifornischen Weizen und als höchsten Wert 5,5 γ je g beim Manitobaweizen.

Obgleich die Anzahl untersuchter Muster nicht gross genug ist, um feststehende Schlüsse hieraus ziehen zu können, geben die gefundenen Werte doch wohl einen Fingerzeig für die Annahme, dass die grossen, hellen Weizenkörner einen geringeren Aneuringehalt aufweisen als die kleineren und dunkel gefärbten Körner. Nehmen wir wieder die extremen Werte, dann zeigt sich, dass die Körner des Manitobaweizens, die dunkel gefärbt und klein von Volumen sind, einen hohen Aneuringehalt besitzen, während die hellen und grösseren Körner des kalifornischen Weizens einen viel geringeren Aneuringehalt haben.

Was die inländischen Weizensorten anbelangt, scheint der rote inländische Weizen etwas reicher an Aneurin als der inländische weisse Weizen zu sein.

§ 3. Untersuchung der Nebenprodukte, die beim Mahlprozess entstehen.

Die in der Literatur bekannten Daten über den Aneuringehalt des in verschiedenen Graden ausgemahlenen Mehles sind sehr unübersichtlich und nicht vergleichbar. Die alten Versuche sind unbrauchbar wegen der unzulänglichen Bekanntheit mit den Faktoren, welche den Tierversuch für das Vitamin B_1 beherrschen.

Von 1930 datieren die Versuche Scheunert's (35), deren ersten Ergebnisse jedoch nicht in internationale Einheiten oder Gammas umzurechnen sind.

In einer Publikation Morgan's (36) finden sich Angaben über den Aneuringehalt von Brot aus verschiedenen Mehlsorten, doch aus seinen Angaben kann man keine Folgerungen auf den Aneuringehalt des gebrauchten Mehles ziehen. Grobes Weizenbrot würde etwa 1 I. E. ($2\frac{1}{2}$—3 γ) je g enthalten.

In einer späteren Mitteilung gibt Scheunert (37) an, dass aus 90 % ausgemahlenem Mehl bereitetes Brot etwa viermal soviel Aneurin enthält als gewöhnliches Weissbrot (75—100 I. E. statt 20—25 I. E.).

Auch Fridericia (38) gibt auf Grund von Wachstumsversuchen

mit Ratten einige Ziffern, jedoch hauptsächlich für Roggenbrot, das aus Roggenmehl verschiedenen Ausmahlungsgrades bereitet ist. Allerdings weist er auf die sehr grossen Mengen Aneurin in dem sog. Streumehl hin, einem Produkt, das erhalten wird, wenn Mehl bis auf etwa 78 % ausgemahlen wird. Der Aneuringehalt desselben soll etwa 6 internationale Einheiten betragen, was etwa einem Aneuringehalt von etwa 18 γ je g entspricht.

Von den in der Einleitung dieses Kapitels beschriebenen Nebenprodukten der Müllerei sind folgende von mir auf ihren Aneuringehalt untersucht: Mehl I, Mehl III, grober Griess, Griess und Kleie.

Aus vorläufigen orientierenden Versuchen hat sich gezeigt, dass die bei der Untersuchung von ungebeuteltem Weizen angewandte Extraktionsmethode nich imstande ist, aus diesen an Aneurin viel reicheren Produkten, in drei Extraktionen alles Aneurin zu entfernen; es erwies sich als nötig, das Mehl noch ein viertes Mal zu extrahieren; der fünfte Extrakt enthielt jedoch kein Aneurin mehr.

Das Protokoll der betreffenden Untersuchung lautet folgendermassen:

25 g Mehl wurden viermal mit 400 ccm Wasser von einem $p_H = 3$ bei 50° extrahiert und zwar bezw. drei Stunden, zwei Stunden, eine Stunde und nochmals eine Stunde. Danach wurden die gesamten Extrakte filtriert. Das Filtrat wurde in zwei Portionen verteilt, und der zweiten Portion wurden 100 γ Aneurin hinzugefügt. Dann wurden jeder Portion 500 mg Frankonit zugesetzt und dieses in der üblichen Weise verarbeitet. Die Oxydation von Portionen von je 50 mg aktiviertem Frankonit wurde mit bezw. 0,4, 0,6 und 0,8 ccm 1 %-igem rotem Blutlaugensalz ausgeführt. Der höchste Ausschlag des Galvanometers wurde als der richtige angenommen; derselbe wurde bei 0,6 und 0,8 ccm Blutlaugensalz gefunden.

Ich erhielt für ein Muster Mehl I die folgenden Ziffern (Ausschläge in mm):

Extrakt	Ausschlag der Blankobestimm.	oxydiert	gesamtes Thiochrom	Chinin-lösung	korrigierter Ausschlag	Ausschlag je γ B_1
ohne B_1-Zusatz	10 (5 + 5)	98	103	98	79	
mit 10 γ B_1	11 (5 + 5)	137	143	98	109	3.0

Dieses Mehl I enthielt 21 γ Aneurin je g.

Für eine gröbere Mehlsorte, Mehl III, wurden nach Extraktion von 10 g folgende Resultate erhalten (Ausschläge in mm):

Extrakt	Ausschlag der Blankobestimm.	oxydiert	gesamtes Thiochrom	Chinin-lösung	korrigierter Ausschlag	Ausschlag je γ B_1
ohne B_1-Zusatz	12 (6 + 6)	81	87	100	65	
mit 10 γ B_1	15 (6 + 9)	114	123	99	93	2.8

Dieses Mehl III enthielt also 46 γ Aneurin je g.

Ausser diesen zwei Mehlsorten, die aus dem eigentlichen feinen Mehl, vermischt mit Teilen aus der Aleuronschicht bestanden, wurden auch die gröberen Körnerteile untersucht, die bei der ersten Passage des Weizens über die gröbsten Walzen entstehen. 25 g grober Griess wurden unter den schon mehrmals beschriebenen Verhältnissen viermal extrahiert. Der Extrakt wurde ferner wieder ebenso behandelt, wie bei Mehl I beschrieben ist. Die Resultate waren folgende (Ausschläge in mm):

Extrakt	Ausschlag der Blankobestimm.	oxydiert	gesamtes Thiochrom	Chinin-lösung	korrigierter Ausschlag	Ausschlag je γ B_1
ohne B_1-Zusatz	7 (4 + 3)	74	77	99	58	
mit 10 γ B_1	9 (4 + 5)	113	118	99	90	3.2

Dieses Muster grober Griess enthielt also 14½ γ Aneurin je g.

Die Bezeichnung grober Griess, ebenso wie übrigens die anderen Bezeichnungen wie Mehl I, II oder III sind nicht exakt festgelegt. Die verschiedenen Fabriken sind es, die ein bestimmtes Mühlenprodukt unter einer dieser allgemein gangbaren Benennungen in den Handel bringen. Daher ist es nicht zu verwundern, dass ein anderes Muster grober Griess, das einer anderen Fabrik entstammte, einen nicht wenig abweichenden Aneuringehalt hatte. Da, wie wir gesehen haben, der Aneuringehalt verschiedener Getreidearten ziemlich viel variieren kann, leuchtet es ein, dass der Aneuringehalt eines Mühlenproduktes dieser Arten eine noch viel globalere Zahl ist.

Extrakt	Ausschlag der Blankobestimm.	oxydiert	gesamtes Thiochrom	Chinin-lösung	korrigierter Ausschlag	Ausschlag je γ B_1
ohne B_1-Zusatz	8 (4 + 4)	92	96	95	76	
mit 10 γ B_1	10 (4 + 6)	131	137	95	108	3.2

Dieses Muster grober Griess enthielt 19 γ Aneurin je g.

Die Untersuchung eines Musters feiner Griess ergab die folgenden Ziffern. Dieser Versuch wurde mit 25 g Griess ausgeführt. Der Hälfte des Extraktes wurden 50 γ Aneurin zugesetzt. Die Adsorption fand statt an 250 mg Frankonit, wovon Portionen von je 50 mg mit bezw. 0,3, 0,5 und 0,7 ccm 1 %-igem rotem Blutlaugensalz oxydiert wurden.

Extrakt	Ausschlag der Blankobestimm.	oxydiert	gesamtes Thiochrom	Chinin-lösung	korrigierter Ausschlag	Ausschlag je γ B_1
ohne B_1-Zusatz	11 (5 + 6)	74	80	90	66	
mit 10 γ B_1	14 (5 + 9)	113	122	90	101	3.5

Der Aneuringehalt war also 7,5 γ je g.

Wird das Vermahlen grosser Stücke fortgesetzt, dann kommen wir zu einem Produkt, das ausser nahezu aller Kleie doch auch noch ziemlich viel Stärke und Bestandteile aus der Aleuronschicht enthält. Dieses Produkt ist als Nahrungsmittel für Menschen nicht geeignet, sondern wird als Viehfutter gebraucht.

Die Verarbeitungsweise dieses Produktes für die Analyse ist gleich derjenigen, die bei Griess beschrieben wurde.

Extrakt	Ausschlag der Blankobestimm.	oxydiert	gesamtes Thiochrom	Chinin-lösung	korrigierter Ausschlag	Ausschlag je γ B_1
ohne B_1-Zusatz	15 (8 + 7)	159	166	94	132	
mit 10 γ B_1	20 (8 + 12)	182	194	90	161	2.9

Der Aneuringehalt war also 18 γ je g.

Wenn die Zerkleinerung der Getreidekörner und das Sieben des Mehles noch weiter fortgesetzt werden, bis fast nur die Kleie übrig geblieben ist, dann erweist sich der Aneuringehalt dieses

Produktes als erheblich gesunken. Für ein Muster Kleie fand ich nämlich bei einer Verarbeitung in der obenbeschriebenen Weise folgende Ziffern (Ausschläge in mm):

Extrakt	Ausschlag der Blankobestimm.	oxydiert	gesamtes Thiochrom	Chinin-lösung	korrigierter Ausschlag	Ausschlag je γ B_1
ohne B_1-Zusatz	10 (5 + 5)	50	55	94	44	
mit 10 γ B_1	13 (5 + 8)	87	95	95	75	3.1

Der Aneuringehalt war also 5,7 γ je g.

Dass auch bei diesem Produkt der Aneuringehalt noch stark wechseln kann, erhellt aus den Analyseresultaten zweier weiteren Muster Kleien aus zwei anderen Fabriken. Bei ihnen fand ich bezw. 9,0 γ und 6,5 γ Aneurin je g. Der Ausschlag je γ Aneurin war in beiden Fällen gleich und zwar 3,2 mm.

Während die Kleien das eine äusserste Produkt des Mahlprozesses darstellen, ist das gegensätzliche Produkt das 00-Mehl. Allgemein wurde angenommen, dass dieses weit ausgemahlene Mehl gar kein oder doch fast kein Aneurin enthalte; die von mir erhaltenen Resultate deuteten jedoch in andere Richtung.

Ich stellte den diesbezüglichen Versuch in der Weise an, dass ich 75 g solchen Mehles dreimal bei 50° mit 1 Liter Wasser extrahierte. Zu der Hälfte des filtrierten gesamten Extraktes setzte ich 50 γ Aneurin hinzu, wonach beide Portionen mit 250 mg Frankonit behandelt wurden. Von dem aktivierten Frankonit wurden Portionen von je 50 mg oxydiert mit bezw. 0,2, 0,4 und 0,6 ccm 1 %-igem rotem Blutlaugensalz. Das Ergebnis war folgendes:

Extrakt	Ausschlag der Blankobestimm.	oxydiert	gesamtes Thiochrom	Chinin-lösung	korrigierter Ausschlag	Ausschlag je γ B_1
ohne B_1-Zusatz	11 (5 + 6)	67	73	86	64	
mit 10 γ B_1	13 (5 + 8)	123	131	86	114	5.0

Der Aneuringehalt ist also 1,7 γ je g.

Dieser keineswegs geringfügige Betrag von 1,7 γ Aneurin je g Mehl steht also eigentlich in Widerspruch mit der laut der Literatur herrschenden Ansicht, dass weit ausgemahlenes Mehl nahezu

kein Vitamin B_1 enthält. JANSEN (39) hatte jedoch schon viel früher konstatiert, dass eine Ernährung mit weissem Reis bei seinen Versuchstieren viel schneller neuritische Erscheinungen verursachte, als wenn denselben feinst ausgemahlenes Mehl verabfolgt wurde.

Meine oben besprochene Untersuchung des hier soeben genannten Musters allerfeinsten Mehles, die später noch durch einige weitere Untersuchungen ergänzt wurde, ist eine weitere Stütze für die Ansicht, dass die Aneurinmengen in derartigem Mehl und mithin auch in Weissbrot nicht so klein sind, vernachlässigt werden zu dürfen, sondern wohl fraglos eine nicht unbedeutende Rolle für den Menschen spielen bei seiner Versorgung mit der täglich benötigten Menge Aneurin.

Ausser dem oben beschriebenen Muster wurden noch zwei andere, von verschiedenen Stellen bezogene Muster Feinstmehl untersucht. Hierfür fand ich bezw. 1,5 γ und 1,8 γ Aneurin je g.

Wenn wir die Gesamtresultate der Untersuchung der Vermahlungsprodukte von Weizen überblicken, dann können wir feststellen, dass das am weitesten von Kleie gereinigte Produkt, das oo-Mehl, am wenigsten Aneurin enthält, wenn auch keineswegs so wenig, dass es zu vernachlässigen wäre. Der hier vorhandene Aneuringehalt beträgt prozentual ungefähr ein Drittel des Gehaltes des ganzen Getreidekorns.

Das entgegengesetzte Endprodukt des Mahlprozesses stellt die Kleie dar. Obgleich dieselbe viel reicher an Aneurin ist als das oo-Mehl, weicht die Aneurinkonzentration doch nicht viel von derjenigen des ganzen Kornes ab; sie ist etwa 1½ mal so gross.

Die grösste Anhäufung von Aneurin wird in den Mittelfraktionen angetroffen; Die Mehlsorten I und namentlich III sind sehr reich an Aneurin (bis zu 50 γ Aneurin je g). Diese Fraktionen sind noch nahezu frei von Kleien, enthalten aber ziemlich grosse Mengen der Aleuronschicht. Je mehr in anderen Mahlprodukten einerseits das feinere Stärkemehl oder anderseits die Kleien an Menge zunehmen, desto mehr sinkt der Aneuringehalt.

Namentlich die Aleuronschicht ist also die Stelle, wo im Getreidekorn die grössten Mengen Aneurin angehäuft sind.

§ 4. Untersuchung einiger Muster von grobem Weizenbrot (Braunbrot).

Ausser den verschiedenen Weizenarten und den Produkten des Mahlprozesses, den sog. Mühlenprodukten, wurden noch einige

Muster grobes Weizenbrot (Braunbrot) auf ihren Aneuringehalt untersucht. Bei der Beurteilung der Ergebnisse dieser Untersuchung ist der Umstand zu beachten, dass die bei Laien gangbare Ansicht, derzufolge Braunbrot ausschliesslich aus ungebeuteltem Mehl bereitet wird, häufig nicht richtig ist. Eine allgemein geltende Aufzählung der für Braunbrot gebräuchlichen Mehlarten ist nicht zu geben, aber wohl kann ich sagen, dass das ungebeutelte Mehl oft sowohl mit 00-Mehl als mit Nachmehlen verschiedener Feinheit vermischt wird. Die von diesen Beimischungen verwendeten Mengen sind bei jedem Bäcker wieder verschieden; nur eine verhältnismässig geringe Anzahl Bäcker gebraucht ausschliesslich ungebeuteltes Mehl.

Aus diesem Grunde schien es mir von Nutzen, auch von dem Braunbrot, wie es an den Konsumenten abgeliefert wird, den Aneuringehalt zu bestimmen.

Als ich mit der Untersuchung begann, standen mir zwei Wege offen. Ich konnte in der bereits mehrmals beschriebenen Weise Brot extrahieren, aber ich konnte auch das Brot erst zerkrümeln, dann in einem Trockenapparat bei nicht zu hoher Temperatur trocknen und schliesslich den Trockenrest zu einem leichter extrahierbaren Produkt vermahlen. Der Nachteil der alten Extraktionsmethode schien, dass die Struktur des Brotes eine völlige Extraktion erschweren konnte, und da, wie vorläufige Versuche gezeigt hatten, diese Struktur bei dem Extrahieren mitunter recht lange intakt bleiben konnte, stellte ich auch einige Versuche mit einer Extraktion der feingemahlenen, getrockneten Brotkrume an. Unwidersprechlich hatte das vorhergehende Trocknen des Brotes ebensoviel „wahrscheinliche Nachteile" wie die direkte Extraktionsmethode. Die Praxis lehrte jedoch, dass für beide Fälle die Beschwerlichkeiten in der Tat mehr Schein als Wirklichkeit waren. Als die ersten Brotmuster auf beide Weisen untersucht waren, zeigte sich, dass sie gleiche Resultate ergaben. Es hatte m.E. somit keinen Sinn, die länger dauernde Verarbeitung via Trocknen des Brotes zu wählen, sodass alle weiteren Muster in der Folge nach der direkten Extraktionsmethode verarbeitet wurden.

Dass die Extraktion des nicht gemahlenen Brotes vollständig gewesen ist, wurde ausser durch das Fehlen von Aneurin in der vierten Extraktionsflüssigkeit, noch durch den Tierversuch bewiesen. Wurde das extrahierte und danach bei 45° getrocknete Brot an Versuchstiere mit einem Aneurindefizit verfüttert, dann

reagierten sie hierauf in keiner Weise. Ihre Wachstumskurve unterschied sich nicht von derjenigen, welche bei Verabfolgung des aneurinfreien Basisfutters erhalten wurde.

Die Extraktion des Brotes wurde folgendermassen ausgeführt: Zwei Schnitte von je 25 g wurden soviel wie möglich verkrümelt und danach dreimal während bezw. 3, 2 und 1 Stunde bei 50° mit 500 ccm Wasser eines $p_H = 3$ extrahiert. Die gesamten Extraktionsflüssigkeiten wurden filtriert und das Filtrat wurde in zwei gleiche Teile verteilt. Dem zweiten Teile wurden 50 γ Aneurin zugesetzt und darauf wurde in beiden Teilen die Adsorption an 250 mg Frankonit ausgeführt. Schliesslich wurden Portionen des aktivierten Frankonits von 50 mg mit 0,3, 0,5 und 0,7 ccm 1 %-igem rotem Blutlaugensalz oxydiert.

Die Resultate waren für 50 g Ausgangsmaterial die folgenden:

Muster	korrig. Ausschlag	Ausschlag je γ	Gehalt
Wasser-Braunbrot	20 mm	2.7 mm	1.5 γ je g
„ „ . . .	29 mm	2.9 mm	2.0 γ „ „
Vollkornbrot	23 mm	2.9 mm	1.6 γ „ „
Wasser-Braunbrot . . .	26 mm	2.3 mm	2.3 γ „ „
Milch-Braunbrot	22 mm	2.8 mm	1.6 γ „ „
„ „ [1] . . .	26 mm	2.5 mm	2.1 γ „ „
Wasser-Braunbrot . [1] . .	26 mm	2.4 mm	2.2 γ „ „
„ „ . . .	28 mm	3.0 mm	1.9 γ „ „
Vollkornbrot	24 mm	2.7 mm	1.8 γ „ „
Milch-Braunbrot	27 mm	2.4 mm	1.4 γ „ „

[1]) Diese beiden Muster rührten von demselben Bäcker her.

Ausser den ziemlich grossen Unterschieden, die, wie sich herausstellte, im Aneuringehalt verschiedener Braunbrotmuster auftreten können, sind besonders die grossen Unterschiede im Ausschlag je γ Aneurin auffallend, welcher Ausschlag von 2,3 bis 3,0 mm wechselt. Vergleichen wir diese Ziffern mit denjenigen der Untersuchung verschiedener Weizensorten, bei welcher die Ausschläge je γ Aneurin von 3,7 bis 4,3 mm wechselten, dann erweist sich die prozentuale Streuung beim Braunbrot als beträchtlich grösser. Es scheint mir nicht unmöglich, dass dies u.a. durch bei dem Backprozess entstandene Stoffe, die der Kruste die dunkle Farbe verleihen, verursacht wird. Die Erfahrung hat nämlich gelehrt, dass farbige Verbindungen, welche an Frankonit adsorbiert wer-

den, auf den Ausschlag je γ Aneurin von Einfluss sein können. Wenn nun der eine Bäcker das Brot länger backen lässt als der andere, könnte die Wirkung der dadurch entstehenden verschiedenen Mengen dieser Stoffe für die grössere Streuung verantwortlich sein.

§ 5. Untersuchung von Roggen.

Bei der Besprechung der Aneurinbestimmung in Weizen ist die Methode ausführlich besprochen worden. Prinzipiell besteht kein Unterschied zwischen der Untersuchung, wie ich sie bei Weizen und bei Roggen anstellte. Ich kann mich daher in der Andeutung der Details also kurz fassen.

Zunächst musste für den Roggenextrakt der Ausschlag des Galvanometers für 1 γ Aneurin bestimmt werden.

Für einen orientierenden Versuch wurde von zwei gleichen Mengen Roggenextrakt ausgegangen. Durch Zusatz von 200 γ Aneurin zu der zweiten Portion wurde in der bereits mehrmals beschriebenen Weise der Ausschlag je γ Aneurin bestimmt. Es zeigte sich, dass dieser 2,6 mm war.

Zugleich wurde kontrolliert, ob das Frankonit alles Aneurin aus dem Extrakt adsorbierte. Frankonit, das zum zweiten Mal dem Extrakt zugesetzt war, ergab nach Oxydation jedoch keine Thiochromfluoreszenz mehr. In der Tat adsorbiert das Frankonit also alles im Extrakt vorhandene Aneurin.

Zum Schlusse sei noch erwähnt, dass viermal extrahierter Roggen getrocknet und mit diesem Rückstand ein Tierversuch angestellt wurde. Die B_1-avitaminotischen Tiere reagierten aber überhaupt nicht auf die Verabfolgung, sodass angenommen werden darf, dass die Extraktion vollständig gewesen ist.

Nach diesen Versuchen wurde der Ausschlag je γ Aneurin in einer ausgedehnteren Reihe bestimmt. Zu gleichen Mengen Roggenextrakt wurden bezw. 50, 100, 150 und 200 γ Aneurin hinzugefügt. Die Adsorption fand an 600 mg Frankonit statt, wovon Portionen von 50 mg oxydiert wurden. Der Ausschlag des Extraktes ohne Aneurinzusatz betrug 23 mm. Für diejenigen Portionen, denen wohl Aneurin zugesetzt war, waren die Ausschläge: 33, 43, 52 und 64 mm, welche Ausschläge denjenigen von 10, 20, 29 und 41 mm für $\frac{50}{600}$ von 50, 100, 150 und 200 γ Aneurin entsprechen. Wir finden also je γ : 2,4, 2,4, 2,3 und

2,5 mm. Durchschnittlich ist dies 2,4 mm oder umgerechnet von Chinin = 70 mm auf Chinin = 75 mm, wird dies 2,6 mm.

Mit Hilfe dieses Wertes von 2,6 mm wurde der Aneuringehalt eines Musters Roggen untersucht.

Zu diesem Zwecke wurden 20 g Roggenmehl auf die mehrmals beschriebene Weise extrahiert. Zu dem filtrierten Extrakt wurden 500 mg Frankonit hinzugefügt, wovon Portionen von 50 mg mit 0,3, 0,5 und 0,7 ccm rotem Blutlaugensalz oxydiert wurden.

Das Galvanometer ergab für die Blankobestimmung einen Ausschlag von 10 mm und für die oxydierte Bestimmung einen Höchstwert von 35 mm. Auf Rechnung des Thiochroms entfiel somit ein Ausschlag von 25 mm.

Eine Schwierigkeit ist hier die Korrektur der Thiochrombildung bei Blankobestimmungen. Ich habe bei der Besprechung der Aneurinbestimmung in Milch und Weizen schon darauf hingewiesen, dass beim Vorhandensein einigermassen grosser Aneurinmengen auch bei der Blankobestimmung Thiochrom gebildet wird. Es erwies sich jedoch als ziemlich einfach, hierfür eine Korrektion vorzunehmen.

Bei der Untersuchung von Roggenextrakt erwiesen sich die Schwierigkeiten jedoch als grösser. Ohne besondere Vorsorgemassnahmen ist der Ausschlag für die Blankobestimmung hoch, z.B. 16 bis 17 mm. Die Butanollösung ergibt dann eine starke blaue Fluoreszenz, welche nach Ansäuern mit starker Salzsäure verschwindet. Durch das Ansäuern wird jedoch die Flüssigkeit trübe, sodass der dann abgelesene Ausschlag von 4 bis 5 mm gewiss zu niedrig ist. Es hat sich jedoch als möglich erwiesen, den Ausschlag der Blankobestimmung innerhalb angemessener Grenzen zu halten, durch das Verfahren, den Sauerstoff vor dem Versuch aus den gebrauchten Chemikalien mit Hilfe eines Stickstoffstromes zu vertreiben. Beachtet man hier alle Vorsorgemassnahmen, dann kann der Ausschlag des Galvanometers für eine Blankobestimmung bis auf ca. 10 mm sinken. Die Butanolschicht ergibt dann zwar noch eine ziemlich schwache blaue Fluoreszenz, doch da wir wissen, dass der Ausschlag über 5 mm und unter 10 mm liegen muss, nehmen wir dann nur einen Ausschlag von 8 mm als richtig an. Der eventuell gemachte Fehler fällt in diesem Falle innerhalb der Genauigkeit des Versuchs.

Der bei der Bestimmung des Aneuringehaltes in Roggen erhaltene Ausschlag von 25 mm muss somit um 10—8 = 2 mm erhöht werden und wird also 27 mm. Da die Chininlösung einen

Ausschlag von 115 mm ergab *), wird der korrigierte Ausschlag 17½ mm, Berechnet mit einem Ausschlag von 2.6 mm je γ Aneurin ergibt dies einen Aneuringehalt im Roggen selbst von 3,4 γ je g.

In derselben Weise wurde noch ein zweites Muster Roggen untersucht. Hier fand ich einen Ausschlag von 15 mm, welcher Ausschlag mit einem Gehalt von 2,9 γ je g übereinstimmt. Auch beim Roggen können wir also ziemlich abweichende Aneuringehalte erwarten. Für soweit die hier gefundenen Werte als repräsentativ für den Roggen im allgemeinen gelten können, zeigt es sich also, dass der Aneuringehalt von Roggen geringer als derjenige von Weizen ist.

§ 6. Untersuchung von Gerste.

Die Untersuchung verlief ganz derjenigen von Roggen parallel. Nur muss bemerkt werden, dass die Ausschläge für die Blankobestimmungen bei Gerste wieder zu mehr normalen Proportionen zurückgekehrt waren. Ohne dass besondere Vorsorgemassnahmen getroffen wurden, betrug der Ausschlag des Galvanometers für eine Blankobestimmung 6 bis 7 mm, wovon 2 bis 3 auf Rechnung des doch gebildeten Thiochroms entfielen. Diese Ziffern wurden bei den folgenden Versuchen berücksichtigt.

Für die Bestimmung des Ausschlages für 1 γ Aneurin in Gerstenextrakt wurden vier Portionen benutzt. Zu der zweiten, dritten und vierten Portion wurden bezw. 50, 100 und 150 γ Aneurin hinzugefügt, worauf alle vier Portionen mit 250 mg Frankonit behandelt wurden. Die Oxydation wurde wieder bei 50 mg aktiviertem Frankonit, bezw. 0,3, 0,5 und 0,7 ccm 1 %-igem rotem Blutlaugensalz ausgeführt.

Die Ausschläge des Galvanometers waren für die vier Frankonitmuster: 35, 64, 93 und 117 mm. Da der Ausschlag für den eigentlichen Extrakt 35 mm beträgt, ist der Ausschlag für die hinzugefügten bezw. 10, 20 und 30 γ Aneurin 29, 58 und 82 mm. Hieraus folgt dann ein Ausschlag von bezw. 2,9, 2,9 und 2,7 mm je γ Aneurin.

An Hand dieser Daten wurde der Aneuringehalt von Gerste nun folgendermassen bestimmt.

20 g Gerste wurden in der üblichen Weise extrahiert. Die Adsorption fand an 500 mg Frankonit statt, wovon später

*) Ausnahmsweise wurde ein anderes Galvanometer gebraucht.

Portionen von 50 mg mit 0,3 0,5 und 0,7 ccm Blutlaugensalz oxydiert wurden. Der Höchstausschlag des Galvanometers für die oxydierten Bestimmungen war 23 mm, grösser als derjenige für die Blankobestimmung, die selbst einen Ausschlag von 8 mm ergeben hatte. Hiervon wird 3 mm durch Thiochrom verursacht, sodass der gesamte durch Thiochrom bewirkte Ausschlag 23 + 3 = 26 mm ist.

Hieraus folgt dann ein Aneuringehalt in Gerste von 4,5 γ je g.

Zur Kontrolle der Extraktion wurde der vierte Extrakt derselben Portion Gerste gesondert mit Frankonit behandelt. Nach Oxydation desselben wurde kein Ausschlag des Galvanometers gefunden, sodass im vierten Extrakt kein Aneurin vorhanden gewesen war.

Mit dem getrockneten Rückstand aller dieser Extraktionen wurde dann noch ein Tierversuch angestellt. Fütterung an B_1-avitaminotische Ratten ergab jedoch keine Abweichung in ihrer Wachstumskurve.

Auf Grund dieser beiden Tatsachen darf somit gefolgert werden, dass die Extraktion vollständig gewesen ist.

Von Gerste wurde nur dieses eine Muster untersucht. Die Untersuchung von Weizen und Roggen hatte bereits gezeigt, dass der Aneuringehalt dieser Zerealien ziemlich abweichende Resultate ergeben kann. Dies wird auch wohl für Gerste gelten.

§ 7. Untersuchung von Mais.

Zuletzt habe ich noch den Aneuringehalt von Mais bestimmt. Die Ausführung war völlig derjenigen von Roggen und Gerste gleich.

Für die Bestimmung des Ausschlages des Galvanometers für 1 γ Aneurin in Maisextrakt wurden 5 Portionen dieses Extraktes benutzt. Die erste Portion diente zur Bestimmung der Menge Aneurin im Extrakt. Zu den folgenden Portionen wurden bezw. 50, 100, 150 und 200 γ Aneurin hinzugefügt. Die Adsorption fand an 600 mg Frankonit statt, wovon Portionen von 50 mg mit 0,3, 0,5 und 0,7 ccm 1 %-igem rotem Blutlaugensalz oxydiert wurden.

Die Ausschläge des Galvanometers betrugen bezw. 17, 28, 36, 48 und 57 mm, sodass die Ausschläge, die auf Rechnung des hinzugefügten Aneurins kommen, bezw. 11, 19, 31 und 40 mm betragen. Diese Ausschläge sind durch $^1/_{12}$ von 50, 100, 150 und

200 γ Aneurin verursacht, sodass die Ausschläge je γ 2,8, 2,4, 2,5 und 2,4 mm betragen.

Ferner wurden 20 g Mais in der bereits mehrmals beschriebenen Weise extrahiert, wonach der Extrakt an 500 g Frankonit adsorbiert wurde. Oxydation von Portionen von 50 mg aktiviertem Frankonit mit 0,3, 0,5 und 0,7 ccm 1 %-igem Blutlaugensalz ergab einen Ausschlag von 21 mm, welcher Ausschlag einer Menge von 4,0 γ Aneurin je g Mais entspricht.

§ 8. Aneurinbestimmung in Kartoffeln.

Auch bei der Aneurinbestimmung in Kartoffeln wurde dasselbe Verfahren angewandt, das auch bei den vorigen Produkten besprochen worden ist.

Zunächst die Extraktion. 38 g Püree von gekochten Kartoffeln wurden dreimal mit 400 ccm Wasser ($p_H = 3$) bei 50° bezw. 3 Stunden, 2 Stunden und 1 Stunde extrahiert. Zu der Hälfte des filtrierten Extraktes wurden 50 γ Aneurin hinzugefügt, worauf in beiden Flüssigkeiten der Extrakt an 250 mg Frankonit adsorbiert wurde. Darauf wurden von den Frankonitmustern Portionen von 50 mg oxydiert.

Das Resultat war ein Ausschlag von 9 mm und einer von 46 mm, bezw. für den Extrakt ohne und denjenigen mit Aneurinzusatz, was einen Ausschlag von 3,7 mm je γ und einen Gehalt von 0,63 γ je g ergibt.

Zunächst wurde wieder kontrolliert, ob das Frankonit alles Aneurin aus dem Extrakt adsorbiert hatte. Da eine zweite Frankonitportion nach Oxydation keine durch Thiochrom verursachte Fluoreszenz zeigte, ergab sich, dass dies in der Tat der Fall gewesen war.

Ferner wurde kontrolliert, ob nach dreimaligem Extrahieren alles Aneurin gelöst war. Ein vierter Extrakt enthielt kein Aneurin mehr. Die Vollständigkeit der Extraktion wurde jedoch ausserdem noch dadurch untersucht, dass die extrahierten Kartoffeln in 25 %-iger Salzsäure aufgelöst wurden. Hierin löst die Stärke auf, während die Gerüststoffe zurückbleiben. Nach Filtrierung über Glaswolle wurde der p_H mit Lauge auf 3 gebracht. Eine hierbei entstandene geringe Trübung wurde abfiltriert und danach wurde das Filtrat mit 250 mg Frankonit behandelt. Oxydation von 50 mg hiervon ergab keinen Ausschlag des Galvanometers. Der Schluss, dass die extrahierten Kartoffeln in der Tat kein Aneurin

mehr enthalten, darf jedoch erst dann gezogen werden, wenn man weiss, dass das Aneurin unter diesen Umständen nicht zersetzt sein kann. Dies wurde denn auch von mir untersucht. Eine Vitaminlösung, welche, in 400 ccm Wasser ($p_H = 3$) gebracht, nach Oxydation von 50 mg der der Lösung zugesetzten 250 mg Frankonit einen Ausschlag von 50 mm ergeben hatte, bewirkte, wenn sie in 400 ccm 25 %-ige Salzsäure gebracht wurde, unter übrigens gleichen Verhältnissen einen Ausschlag von 34 mm, woraus folgt, dass reines Vitamin unter diesen Umständen sich teilweise zersetzt. Auch musste noch ermittelt werden, wie Aneurin in Kartoffeln sich gegenüber 25 %-iger Salzsäure verhält. Als aber der obenbeschriebene Versuch mit extrahierten Kartoffeln + Aneurin angestellt wurde, zeigte sich, dass der Verlust nicht grösser war. Mit Wasser betrug der Ausschlag 64 mm, mit starker Salzsäure war er 45 mm.

Nunmehr dürfen wir also schliessen, dass Aneurin sich in Kartoffelextrakt in 25 %-iger Salzsäure zwar teilweise, aber doch nicht ganz zersetzt.

Meine Folgerung, dass die Kartoffeln ganz extrahiert waren, ist somit begründet.

Darauf wurde der Ausschlag je γ Aneurin in einer etwas ausgedehnteren Reihe bestimmt. Zu drei Portionen Kartoffelextrakt wurden bezw. 50, 100, 150 γ Aneurin hinzugefügt. Es wurde an 250 mg Frankonit adsorbiert, wovon Portionen von 50 mg oxydiert wurden.

Der Ausschlag für den Extrakt selbst betrug 24 mm, derjenige für die Extrakte mit hinzugefügtem Aneurin 60, 98 und 130 mm, sodass die Ausschläge für das hinzugefügte Aneurin 36, 74 und 106 mm betrugen, welche Ausschläge einem Ausschlag von 3,6 mm je γ entsprechen.

Ausser dem Aneuringehalt der gekochten Kartoffeln wurde auch die Aneurinmenge im Kochwasser bestimmt, da ja zu erwarten ist, dass ziemlich viel Aneurin während des Kochens aufgelöst wird.

Eine ausführliche Besprechung der Untersuchung dieses Kochwassers erübrigt sich hier aber. Es sei erwähnt, dass der Ausschlag je γ im Kochwasser durchweg etwas niedriger als im letzten Extrakt ist.

Die Daten der Untersuchung einiger Kartoffelsorten sind in nachstehender Tabelle zusammengestellt. In derselben ist die Menge Aneurin im Extrakt von 50 g Kartoffeln und die

Aneurinmenge im Kochwasser angegeben. Die letzte Spalte gibt schliesslich die Summe beider Aneurinmengen, die auf 100 g Ausgangsmaterial berechnet wurde.

Kartoffelsorte	Menge Vit. B_1 in 50 g gekochten Kartoffeln	Menge Vit B_1 im Kochwasser	Vorhandene Gesamtmenge Vit. B_1 in 100 g geschälten Kartoffeln
Zeeuwsche blauwen	26 γ	5 γ	62 γ
Red Star	29 γ	26 γ	110 γ
Roodzandzaad	11 γ	34 γ	90 γ
Malta	10 γ	14 γ	48 γ
Blauwpitten	21 γ	—	—
Bintjes	23 γ	4 γ	54 γ

Auffallend ist der Umstand, dass bei der einen Kartoffelsorte viel mehr Aneurin in das Kochwasser übergeht als bei der anderen Sorte. Dies scheint mit der Tatsache zusammenzuhängen, dass die eine Kartoffel mehr zerkocht als die andere, wodurch auch mehr einwärts liegende Teile extrahiert werden.

Die diesbezüglichen Versuche werden fortgesetzt werden.

NACHSCHRIFT.

In den vorstehenden Abhandlungen über die Thiochrommethode für die Bestimmung des Vitamins B_1 ist ausschliesslich auf die Bestimmung des freien Aneurins geachtet.

Wir wissen jetzt aber, dass das Aneurin seine Bedeutung dem Umstande verdankt, dass es ein Bestandteil der Karboxylase ist, eines Fermentes, das Brenztraubensäure in Azetaldehyd und Kohlensäure zersetzt. Dieses Ferment ist aufgebaut aus einem Eiweiss, an welches Aneurinphosphat gekoppelt ist. Es leuchtet also ein, dass wir, wenn wir den Wert eines bestimmten Produktes als Vitamin B_1-Lieferanten kennen lernen wollen, dieses Produkt nicht nur auf die Anwesenheit von Aneurin, sondern ebensosehr auf diejenige von Aneurinphosphat und eventuell vorhandene Karboxylase untersuchen müssen.

Anfänglich war die Thiochrommethode allein für die Bestimmung des freien Aneurins ausgearbeitet; sie beruht auf dem Umstande, dass das Thiochrom aus der wässerigen Lösung mit Isobutanol ausgeschüttelt werden kann.

Später zeigte sich Westenbrink und Jansen (41), dass bei der Oxydation von Aneurin zu Thiochrom auch eventuell vorhandenes Aneurinphosphat oxydiert wird und zwar zu Thiochromphosphat. Dieses Thiochromphosphat zieht jedoch nicht in das Isobutanol, sondern bleibt in der wässerigen Schicht zurück. Westenbrink und Goudsmit (42) ist es nun gelungen, auch die Menge Thiochromphosphat quantitativ zu bestimmen. Durch das Verfahren, bei ihren Versuchen mit tierischem Gewebe erst noch eine Pepsinspaltung zu bewirken, konnten sie auch die Menge Karboxylase selbst bestimmen.

Aus ihren Versuchen erhellt, dass in tierischem Gewebe die Menge Co-Karboxylase die Menge Aneurin weit übertrifft. Ausführliche Daten sind hierüber in ihrer Publikation in Enzymologia (43) zu finden.

Diese Mitteilungen Westenbrink's und Goudsmit's erfolgten

grösstenteils nach dem Beendigen der von mir angestellten Untersuchungen, sodass ich sie dabei nicht genau verfolgen konnte. Später ausgeführte globale Untersuchungen lehrten mich jedoch, dass die untersuchten Weizensorten so gut wie sicher kein Aneurinphosphat enthalten haben werden. Ob sie Karboxylase enthalten, habe ich nicht untersucht.

Für Milch bleibt die Möglichkeit der Anwesenheit von Aneurinphosphat bestehen. Bisweilen konnte in der Tat eine schwache Fluoreszenz der Wasserschicht konstatiert werden. Eine nähere Untersuchung wird dies jedoch noch aufklären müssen.

SAMENVATTING.

Inleiding.

Er is in de ontwikkeling van onze kennis van de vitamines een merkwaardige paralleliteit te constateeren. Toen in 1896 door de proeven van EYKMAN en GRIJNS voor hen was komen vast te staan, dat de klassieke voedingsleer van VOIT onvolledig was en dat een regelmatige toevoer van de benoodigde hoeveelheden eiwitten, koolhydraten, vetten en minerale zouten niet voldoende was om proefdieren in het leven te houden, hadden zij deze conclusie op biologisch feitenmateriaal gebaseerd. En al de in latere jaren daarop volgende proeven waren eveneens biologisch georiënteerd. Zoowel HOPKINS als MC. COLLUM en DAVIES, HOLST en FRÖHLICH, FUNK en nog zoovele anderen, deden hun opzienbarende ontdekking bij het verrichten van dierproeven. De eerste phase in de ontwikkeling van de vitamineleer was ongetwijfeld een biologische.

Zij, die van het bestaan van de vitamines overtuigd waren, stelden weldra pogingen in het werk deze merkwaardige stoffen te isoleeren, en hiermede trad de tweede phase in de ontwikkeling van het vitamine-onderzoek in. Aanvankelijk echter zonder veel succes. Eerst in 1926 slaagden JANSEN en DONATH erin een zuiver vitamine in handen te krijgen, namelijk het anti-beriberi vitamine. Tot dien tijd moest men het vitamine-onderzoek voortzetten, zonder ooit een dergelijke vitamine in handen gehad te hebben.

De derde phase trad in, toen men ging probeeren door middel van dierproeven de hoeveelheid van een bepaald vitamine te bepalen. Voor deze metingen moest men speciale eenheden invoeren, daar de algemeene gewichtseenheid, de gram, niet gebruikt kon worden, aleer men de intensiteit van de werking van het zuivere vitamine zelf bepaald had.

Deze nieuwe eenheden verkreeg men door standarisatie van de dierproef en men sprak af, dat men een bepaald gedrag van het proefdier als het gevolg van één eenheid van dat vitamine zou beschouwen. Aan deze methode bleken echter vele nadeelen verbonden te zijn. In de eerste plaats omdat telkens nieuwe standarisatiemethoden voorgesteld en dan door enkele onderzoekers

geaccepteerd werden, zoodat weldra een groot aantal onderling verschillende eenheden ontstond, hetgeen veel verwarring stichtte. Bovendien zijn dierproeven onnauwkeurig en vele onderzoekers, die oogenschijnlijk volgens hetzelfde voorschrift werkten, kregen toch nog sterk uiteenloopende resultaten.

Het was een groote verbetering toen door de Hygiënische Organisatie van den Volkenbond voor de verschillende vitamines internationale eenheden werden vastgesteld, waardoor de diverse in gebruik zijnde methoden alle geijkt konden worden op eenzelfde, door die Organisatie beschikbaar gesteld, preparaat.

Het was een tweede principieele vooruitgang toen men eenerzijds chemische bepalingsmethoden voor de vitamines vond en anderzijds deze vitamines in zuiveren toestand in handen kreeg. Men was nu niet meer op het uitsluitend gebruik van dierproeven aangewezen en men kon overgaan tot het invoeren van de γ als eenheid.

De eerste, voor de praktijk bruikbare, chemische bepalingsmethode voor vitamine B_1 is in 1935 door JANSEN gegeven. Deze methode is door mij uitgewerkt en toegepast op eenige levensmiddelen, waarbij is gebleken, dat zij daar, mits juist toegepast, steeds goede resultaten geeft.

Hoe staat nu de chemische methode tegenover de biologische? Maakt de chemische het gebruik van de biologische methode overbodig, hebben wij beide methoden noodig of is de beteekenis van de chemische slechts van secundair belang? Alle drie de standpunten vinden bestrijders en verdedigers. Het lijkt mij dienstig hier de beteekenis van beide methoden tegenover elkaar te plaatsen en tegen elkaar af te wegen, teneinde te waarschuwen tegen overdrijving, zoowel naar de eene als naar de andere zijde.

Het is fout om de chemische bepalingsmethode en de dierproef als concurrenten van elkaar te beschouwen. Veeleer moeten zij elkaar aanvullen, en welke van de twee voor een bepaald onderzoek gebruikt zal moeten worden, hangt geheel af van de doelstelling van dat onderzoek.

Qua methode heeft de dierproef zeer vele nadeelen. Ze duurt lang en ze vergt zeer veel diermateriaal voor de verkrijging van tenminste eenigszins nauwkeurige uitkomsten. Vooral op laboratoria die zich niet continu met vitaminebepalingen behoeven bezig te houden, brengt het instandhouden van een dierenstal onevenredig hooge kosten met zich mede.

Daarentegen heeft de chemische methode op deze punten vele

voordeelen. De tijd, noodig voor een bepaling, duurt meestal evenveel uren als de dierproef dagen of zelfs weken. Een bepaling is vrijwel steeds met een nauwkeurigheid van 10 % uit te voeren. Slechts zelden is de fout grooter, terwijl in dat geval de nauwkeurigheid door verbetering van de methode nog wel op te voeren zal zijn. Tenslotte zijn de kosten veel geringer. Op grond van deze overwegingen alleen zou de chemische bepalingsmethode dus zeker de voorkeur verdienen boven de dierproef. Hiermede is de zaak echter nog niet afgedaan.

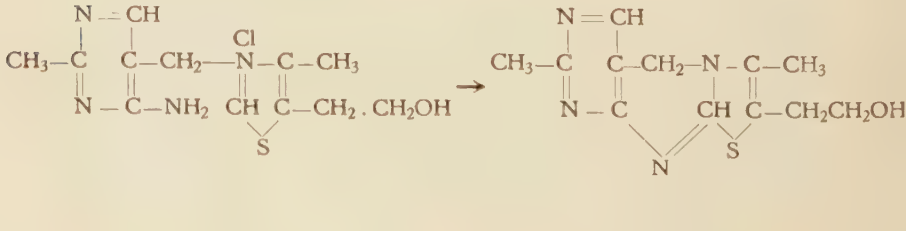
De chemische methode kan ons namelijk weinig leeren omtrent de resorbeerbaarheid van het aan het lichaam toegevoegde vitamine. Willen wij over het gedrag van het vitamine ten aanzien van ons lichaam iets te weten komen, dan kan de dierproef daartoe veel beter dienen dan de chemische methode, waarbij echter niet vergeten mag worden, dat de proefdieren op een andere wijze zouden kunnen reageeren dan de mensch.

De chemische bepalingsmethode en de dierproef vullen elkaar dus op gelukkige wijze aan. In vele gevallen kan echter de tot nu toe gebruikte dierproef vervangen worden door de eenvoudiger uit te voeren chemische bepalingsmethode. Door de toepassing van beide methodes kunnen resultaten aan elkaar getoetst worden, en hierbij aan den dag tredende verschillen kunnen even zoovele waardevolle aanwijzingen geven voor het ontdekken van nieuwe factoren.

In dezen zin is het vinden van de chemische bepalingsmethode voor het vitamine B_1 als een belangrijke stap voorwaarts te beschouwen. Moge de toepassing van deze methode het aneurinevraagstuk nader tot zijn oplossing brengen.

Resultaten van het onderzoek.

De thiochroommethode van Jansen is gebaseerd op de oxydatie van aneurine tot thiochroom in alkalisch milieu, waarbij zich de volgende reactie afspeelt:



Het bij de oxydatie gevormde thiochroom wordt eerst met isobutanol uit het reactiemengsel uitgeschud, waarna de hoeveelheid ervan wordt gemeten aan de hand van de intensiteit van het bij de bestraling met ultra-violet licht ontstaande fluorescentielicht. Voor deze meting wordt een seleencel gebruikt, welke methode de voorkeur verdient boven de visueele.

Bij betrekkelijk geconcentreerde oplossingen (minstens 5 γ per cc.) kan de oxydatie eventueel direct in deze oplossing uitgevoerd worden, doch bij meer verdunde oplossingen is dit niet meer mogelijk. Dan is het noodig de hoeveelheid aneurine eerst op te hoopen, bijvoorbeeld door adsorptie aan frankonit KL, een soort Voller's aarde. Door daarop een bepaalde hoeveelheid van dit geactiveerde frankonit in sterk alkalisch milieu te oxydeeren, wordt ook dan het aneurine omgezet in thiochroom dat, zooals reeds gezegd, met isobutanol wordt uitgeschud, waarna dan de meting van de intensiteit van het fluorescentielicht kan plaats vinden.

Bij een nader onderzoek van deze methode traden een tweetal belangrijke feiten aan het licht. JANSEN had gevonden, dat bij oxydatie van 1 γ aneurine tot thiochroom de galvanometer bij de meting van de intensiteit van het fluorescentielicht, een uitslag gaf van ongeveer 5 mm. Deze uitslag werd gevonden onder dezelfde omstandigheden, waarbij een 1 % kinine-oplossing in verdund zwavelzuur een uitslag van 75 mm gaf. Was de uitslag voor deze standaard kinine-oplossing niet gelijk aan 75 mm. doch, onder invloed van geringe veranderingen in de intensiteit van het door de analyselamp uitgestraalde ultra-violette licht, iets hooger of iets lager, dan moest de afgelezen uitslag van den galvanometer op dezen standaard-uitslag omgerekend worden.

Het bleek mij echter, dat de aanname van JANSEN, dat 1 γ aneurine tot thiochroom geoxydeerd, een uitslag van 5 mm geeft, slechts in enkele gevallen juist is. De uitslag voor (kortheidshalve gezegd) 1 γ aneurine is namelijk afhankelijk van:

1. de hoeveelheid geactiveerd frankonit die geoxydeerd wordt,
2. het product dat onderzocht wordt.

Ad. 1. Wanneer een bepaalde hoeveelheid aneurine, geadsorbeerd aan bijvoorbeeld 50 mg frankonit, geoxydeerd wordt, dan blijkt de uitslag van den galvanometer een andere te zijn dan wanneer diezelfde hoeveelheid aneurine aan 100 mg frankonit

geadsorbeerd zou zijn geweest. Door een reeks van proeven kon ik bewijzen, dat dit veroorzaakt wordt door het feit, dat niet al het thiochroom in de butanollaag trekt, doch dat een deel aan het frankonit geadsorbeerd blijft. Deze adsorptie brengt met zich mede, dat wel evenredigheid bestaat (tenminste binnen de nauwkeurigheid van de proef) tusschen de aanwezige hoeveelheid thiochroom en den uitslag van den galvanometer (omdat van iedere hoeveelheid thiochroom eenzelfde percentage geadsorbeerd wordt), doch dat wanneer de hoeveelheid frankonit grooter wordt, ook een grooter deel van het thiochroom geadsorbeerd wordt. Zoo adsorbeeren 50 mg frankonit ongeveer 10 %, 200 mg frankonit ruim 30 % van de totale hoeveelheid thiochroom.

Dit alles brengt met zich mede, dat steeds eenzelfde hoeveelheid geactiveerd frankonit geoxydeerd moet worden. Ik verkreeg de beste resultaten bij oxydatie van 50 mg van dit frankonit.

Ad. 2. Ik kon eveneens aantoonen, dat het verschil uitmaakt of men aneurine bepaalt in een zuivere oplossing, in melk of in extracten van tarwe, rogge, maïs, e.d. Voor een zuivere aneurineoplossing vindt men een uitslag van 5,6 mm per γ (indien porties van 50 mg geactiveerd frankonit geoxydeerd worden), en ook voor melk blijkt de uitslag ongeveer dezelfde te zijn (5,5 mm per γ). Voor tarwe-extract bedraagt hij daarentegen ongeveer 4 mm en voor rogge slechts $2\frac{1}{2}$ mm. Ook binnen een bepaald product is weer variatie mogelijk. Zoo geeft de eene tarwesoort een uitslag van den galvanometer van 3,7 mm per γ, terwijl een andere soort wel 4,3 mm kan geven.

Ieder product blijkt een eigen uitslag per γ aneurine te geven. Deze moet dus steeds opnieuw bepaald worden.

Uitvoerige onderzoekingen hebben duidelijk gemaakt, dat dit verschil veroorzaakt wordt door het feit, dat behalve het aneurine ook nog andere stoffen aan het frankonit geadsorbeerd worden, welke stoffen na de uitvoering van de oxydatie eveneens in de isobutanollaag terecht komen en hier een bepaald deel van het fluorescentielicht adsorbeeren. Deze storing verloopt echter geheel regelmatig en uit zich dan ook op een dusdanige wijze, dat voor iedere γ thiochroom die aanwezig is, de galvanometer niet een uitslag van 5,6 mm doch een van een geringer aantal millimeters geeft. Dit in rekening brengend, kan men niettemin het juiste aneurinegehalte bepalen.

Op grond van deze, voor de bepaling zoo belangrijke feiten, moet ik de proeven van PYKE (44) zoowel als die van W. KARRER en KUBLI (45) als een onjuiste uitvoering van de thiochroommethode beschouwen. Zij hebben geen van beiden met deze twee belangrijke factoren rekening gehouden. Dat PYKE bij vergelijking van zijn resultaten met die van dierproeven tot te lage resultaten komt, is niet alleen toe te schrijven aan het reeds door WESTENBRINK en GOUDSMIT (46) geconstateerde feit, dat bij dierlijke weefsels een groote hoeveelheid co-carboxylase aanwezig is, doch zeer zeker ook aan het feit, dat hij de door mij geconstateerde invloeden niet in rekening gebracht heeft.

Bij het toepassen van de thiochroommethode op de aneurinebepaling in eenige levensmiddelen, ben ik tot de volgende resultaten gekomen.

Melk.

Bij het onderzoek van 135 monsters slijtersmelk, gedaan in de maand September 1937, bleek dat het aneurinegehalte van deze slijtersmelk groote verschillen kan vertoonen. Toen ik in een grafiek de frequentie van een bepaald aneurinegehalte uitzette tegen dat aneurinegehalte, bleek, dat de dan ontstaande curve twee toppen had, liggende respectievelijk bij 180 γ—190 γ en bij 220 γ—230 γ aneurine per liter. Het lijkt mij mogelijk, dat dit erop zou wijzen, dat er een min of meer principieel verschil bestaat tusschen het aneurinegehalte van ochtend- en van avondmelk. Deze mogelijkheid wordt mijns inziens nog ondersteund door het feit, dat het meest voorkomende daggemiddelde bij 205 γ—209 γ ligt, dus juist tusschen de beide toppen in. Een uitgebreider onderzoek is echter noodig om tot definitieve conclusies te kunnen komen.

Ook werd nagegaan of verschillende pasteurisatiemethoden van invloed op het aneurinegehalte van melk zijn. Het is mij gebleken, dat noch de bij 74° stroomend gepasteuriseerde melk, noch de bij 90°—92° gepasteuriseerde melk een daling van het aneurinegehalte vertoont. Zelfs wanneer men onder huishoudelijke omstandigheden de melk 5 minuten laat doorkoken, is nog geen daling van het aneurinegehalte te constateeren. Pas bij een kooktijd van langer dan 5 minuten treden verliezen op.

Vervolgens is door mij nog nagegaan of op het aneurinegehalte van verschillende typen melk een seizoensinvloed te constateeren

is. Onderzocht werd modelmelk, stroomend gepasteuriseerde melk en melk geleverd door een tweetal slijters. De monsters werden steeds van denzelfden leverancier betrokken. Hoewel ik dadelijk de restrictie maak, dat aan een eenmalig onderzoek niet een te groote waarde toegekend mag worden, kan ik van de door mij verkregen cijfers toch wel een reëele interpretatie geven.

Bij de modelmelk (onderzocht van 1 Augustus 1937 tot 10 Augustus 1938) viel te constateeren, dat in de maanden Augustus en September 1937 een sterke stijging van het aneurinegehalte plaats had. In October zette een daling in, die doorzette tot eind Februari. In Maart viel een kortstondige stijging te constateeren, waarna echter een hernieuwde daling inzette, welke tot in Mei voortduurde. Daarna viel een regelmatige stijging tot het eind van het onderzoek toe, te constateeren.

Bij de stroomend gepasteuriseerde melk viel eenzelfde tendenz, zij het verzwakt, waar te nemen.

De slijtersmelk gaf echter een ander beeld. De schommelingen in het aneurinegehalte waren hier grooter dan bij de vorige melktypen, terwijl bij de melk, geleverd door een dier slijters, duidelijk een maximum in de wintermaanden viel te constateeren. De mogelijkheid bestaat, dat het voeren met schillen e.d. gedurende de wintermaanden voor dit betrekkelijk hooge aneurinegehalte aansprakelijk gesteld kan worden. Ook hieromtrent bestaat echter geen absolute zekerheid.

Ook kon nog geconstateerd worden, dat het aneurinegehalte van melk, van verschillende koeien afkomstig, zeer groote verschillen kan vertoonen, varieerend van minder dan 100 γ tot meer dan 400 γ per liter. Blijkens mijn gegevens is het waarschijnlijk te achten, dat bij een dergelijk hoog aneurinegehalte een lage melkgift behoort, zoodat de spreiding van de per melkgift afgescheiden hoeveelheid aneurine geringer is dan die van de aneurinegehalten van de melk.

Granen.

Als eerste van de diverse granen werd de tarwe onderzocht. Hierbij trad aan het licht, dat voor verschillende tarwesoorten nog vrij groote variaties in het aneurinegehalte mogelijk zijn. Voor de diverse soorten varieerde dit van 3,2 γ tot 5,5 γ per gram, waarbij bleek, dat tarwesoorten met een groote, lichte korrel minder aneurine bevatten dan die met kleine of donkerder korrels

Uit het onderzoek van de verschillende producten bij het maalproces van de tarwe ontstaan, is duidelijk gebleken, dat het aneurine voornamelijk in de aleuronlaag voorkomt. Noch het eene uiterste product van het maalproces, het z.g. patentmeel, noch het andere uiterste, de zemelen, bevatten groote hoeveelheden aneurine. Deze treffen we wel aan in het z.g. achtermeel, maalproducten die wel tamelijk veel van de aleuronlaag, doch geen zemelen bevatten.

Echter dient opgemerkt te worden, dat het oo-meel, een zeer fijne meelsoort, toch meer aneurine bevat dan gewoonlijk wordt aangenomen. De gangbare meening dat meelsoorten van een geringen uitmalingsgraad geen of nagenoeg geen aneurine bevatten, is onjuist. JANSEN (47) heeft er al jaren geleden op gewezen, dat bij het voederen van witte rijst aan proefdieren, veel eerder polyneuritische verschijnselen optreden dan wanneer wit tarwemeel gegeven wordt. Echter dient bij de beoordeeling van de waarde van dit witte meel als aneurine-leverancier bedacht te worden, dat wij meer aneurine noodig hebben naarmate wij meer koolhydraten moeten verteren. De hoeveelheid aneurine in wit meel is echter juist iets te laag voor de omzetting van het eigen koolhydraat. Wij kunnen dus nooit door het eten van witbrood (al bevat dit dan ook aneurine) een op grond van andere oorzaken ontstaan aneurine-tekort aanvullen.

Anders is het met bruinbrood, dat twee- of driemaal zooveel aneurine bevat dan witbrood en dus een overmaat bevat ten opzichte van de eigen koolhydraathoeveelheid. Daarom is bruinbrood, in tegenstelling tot witbrood, wel in staat een aneurinetekort aan te vullen.

Hier volgt een kort overzicht van het aneurinegehalte van de verschillende maalproducten van tarwe.

Ongebuild tarwemeel	3,5—5 γ per gram
Patentmeel	1,5—1,8 γ per gram
Gries	5—10 γ per gram
Grint	15—20 γ per gram
Meel I	20—25 γ per gram
Meel III	40—50 γ per gram
Schroot	15—20 γ per gram
Zemelen	5—10 γ per gram

Gezien de varieerende samenstelling van het meel waaruit bruinbrood gebakken wordt, leek het mij gewenscht, ook het aneurinegehalte van dit brood zelf te bepalen. Ik vond hiervoor gehalten, die wisselden van 1,5 tot 2,5 γ per gram brood. Hierbij moet in aanmerking genomen worden, dat bruinbrood ongeveer 40 % water bevat.

Bij het onderzoek van een tweetal rogge-monsters, werd een aneurinegehalte van 2,9 γ en van 3,4 γ per gram gevonden. Voor een monster gerst vond ik 4,5 γ en voor een monster maïs 4,0 γ. Deze cijfers zijn echter aan slechts enkele monsters bepaald en dus als globaal te beschouwen. Ook hier zullen wel verschillen, afhankelijk van ras en andere factoren, te constateeren zijn.

Aardappelen.

Tenslotte werd nog het aneurine-gehalte van aardappels bepaald. Ook hier bleken tamelijk groote variaties op te kunnen treden, daar de gevonden waarden uiteen liepen van 50 γ tot 110 γ per 100 gram aardappels. (Daar aardappels ± 80 % water bevatten, is dit op de droge stof berekend, vijfmaal zooveel).

Van groot belang is het feit, dat bij het koken van de aardappels een aanzienlijk deel van het aneurine in het kookwater over kan gaan, en wel des te meer naarmate de aardappels meer stuk koken. In sommige gevallen bedroeg het verlies bijna 80 %, in andere daarentegen slechts 15 %. Wel een bewijs van hoeveel belang het is om bij het klaar maken van ons voedsel te letten op een zoo doelmatig mogelijke bereidingswijze.

LITERATUUR.

1. R. R. Williams en Waterman, J. biol. Chem. **78**, 311 [1928].
2. W. H. Eddie c.s., J. biol. Chem. **87**, 729 [1930].
3. C. W. Carter, Biochem. J. **24**, 1832, 1844 [1930].
4. H. W. Kinnersley, Biochem. J. **22**, 277 [1928], **24**, 1820, 1822 [1930].
5. A. Windaus, Z. physiol. Chem. **204**, 123 [1932].
6. H. Chick en M. H. Roscoe, Biochem. J. **23**, 498 [1929], **24**, 1744 [1930], **25**, 1205 [1931], **26**, 1223 [1933].
7. V. Reader, Biochem. J. **24**, 77 [1930].
8. H. Chick en A. M. Copping, Biochem. J. **24**, 1764 [1930].
9. P. György, Biochem. J. **29**, 741 [1935].
10. H. C. Sherman, Chemistry of Food and Nutrition.
11. A. Scheunert, Chem. d. Zelle und Gewebe **13**, 41 [1926].
12. M. Smith, Public Health Report **45**, 116 [1930].
13. R. Peters en N. Gavrilescu, Biochem. J. **25**, 1397, 2150 [1931].
14. R. Peters c.s., Biochem. J. **26**, 1872 [1932], **29**, 5363 [1935].
15. H. G. K. Westenbrink en A. Polak, Rec. Trav. Chim. Pays Bas **56**, 315 [1937].
16. L. J. Harris, Biochem. J. **28**, 602 [1934].
17. J. P. Spruyt, Een chemische methode voor de keuring van rijst op het gehalte van vitamin B1, Diss., Amsterdam, 1933.
18. W. M. Ottow, Geneesk. Tijdschrift, Ned. Indië, **55**, 75 [1915].
19. A. Jendrassik, J. biol. Chem. **7**, 129 [1923].
20. H. W. Kinnersley en R. Peters, Biochem. J. **28**, 667 [1934].
21. H. J. Prebluda, Science **84**, 488 [1936].
22. H. Willstaedt en F. Barany, Enzymologia **5**, 316 [1938].
23. B. C. P. Jansen, Rec. Trav. Chim. Pays Bas **55**, 1046 [1936].
24. R. Kuhn c.s., Z. physiol. Chem. **234**, 196 [1935].
25. F. H. Cohen, Rec. Trav. Chim. Pays Bas **54**, 133 [1935].
26. H. G. K. Westenbrink en J. Goudsmit, Rec. Trav. Chim. Pays Bas **56**, 803 [1937].
27. T. B. Osborne en L. B. Mendel, J. biol. Chem. **34**, 537 [1918].
28. C. Kennedy en R. A. Dutcher, J. biol. Chem. **50**, 339 [1922].
29. J. Outhouse c.s., J. biol. Chem. **73**, 203 [1927].
30. P. Reyer, Arch. Kinderheilk. **77**, 161 [1926], **84**, 55 [1928].
31. C. H. Hund en W. F. Kraus, J. biol. Chem. **79**, 733 [1928].
32. L. T. Samuels en F. C. Koch, J. Nutrition **5**, 307 [1932].
33. De Caro en Speyer, Quad. Nutriz. **2**, 171 [1935].
34. L. S. Fridericia, J. Hygiene **27**, 70 [1927].
35. A. Scheunert, Vit. Gehalt d. D. Nahrungsm. II. Mehl und Brot. [1930].
36. B. G. Morgan, Cereal Chemistry **12**, 390 [1935].
37. A. Scheunert, D. landwirtsch. Rundschau S. Heft 4.
38. L. S. Fridericia, Ve Congrès Intern. Techn. et Chim. Industries Agricoles, Scheveningen 1937.

39. B. C. P. Jansen, Meded. Burgerl. Geneesk. Dienst Ned. Indie **1**, 86 [1923].
40. T. W. Birch en P. Mann, Biochem. J. **28**, 622 [1934].
41. H. G. K. Westenbrink en B. C. P. Jansen, Acta brevia Neerl. **8**, 119 [1938].
42. H. G. K. Westenbrink en J. Goudsmit, Nature **142**, 150 [1938].
43. H. G. K. Westenbrink en J. Goudsmit, Enzymologia **5**, 307 [1938].
44. M. A. Pyke, Biochem. J. **31**, 1958 [1937].
45. W. Karrer en U. Kubli, Helv. Chim. Act. **20**, 369, 1147, [1937].
46. H. G. K. Westenbrink en J. Goudsmit, Nature **142**, 150 [1938].
47. B. C. P. Jansen, Meded. Burgerl. Geneesk. Dienst Ned. Indië **1**, 86 [1923].